

Université de Montréal

**CO-EXPRESSION DE LA PROSTAGLANDINE E SYNTHÉTASE  
MICROSOMALE-1 ET DE LA CYCLO-OXYGÉNASE-2 PAR DES  
CHONDROCYTES ARTICULAIRES ÉQUINS SUIVANT UNE STIMULATION  
PAR L'INTERLEUKINE-1 $\beta$**

par

Judith FARLEY, DMV

11639145

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques

Août 2005

© Judith Farley, 2005



SF

607

U54

2005

V. 028

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

CO-EXPRESSION DE LA PROSTAGLANDINE E SYNTHÉTASE MICROSOMALE-1  
ET DE LA CYCLO-OXYGÉNASE-2 PAR DES CHONDROCYTES ARTICULAIRES  
ÉQUINS SUIVANT UNE STIMULATION PAR L'INTERLEUKINE-1 $\beta$

présenté par :

Judith FARLEY, DMV

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

André Bisailon, président-rapporteur

Sheila Laverty, directrice de recherche

Jean Sirois, codirecteur

Christine Théoret, membre du jury

## Résumé

L'ostéoarthrose, un processus articulaire dégénératif, revêt une importance significative dans le domaine des chevaux de course. L'implication de l'inflammation dans la pathogénie de l'ostéoarthrose est bien reconnue ainsi que le rôle majeur joué par la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), un métabolite de l'acide arachidonique, dans toutes les phases de la maladie. Le but de notre étude consistait en la caractérisation de l'expression de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et de la prostaglandine E synthétase microsomale-1 (mPGES-1), et la régulation de la production de la PGE<sub>2</sub> par des chondrocytes articulaires équins normaux.

Des cultures en monocouche de chondrocytes provenant de sept chevaux adultes ont été stimulées avec différentes concentrations (2,5, 5, 10 et 20 ng/mL) d'interleukine-1 $\beta$  recombinante humaine (rhIL-1 $\beta$ ) durant 24 heures, puis avec une concentration de rhIL-1 $\beta$  de 5 ng/mL durant 3, 6, 9, 12 et 24 heures. La concentration de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture a été mesurée par radioimmunoessai. Après extraction, l'expression de l'ARN messager (ARNm) de la COX-2 et de la mPGES-1 a été étudiée par amplification en chaîne par polymérase-transcriptase inverse (RT-PCR) et par la technique de Southern. Finalement, des analyses western Blot ont été faites sur des extraits cellulaires pour caractériser l'expression des protéines COX-2 et mPGES-1.

La stimulation des chondrocytes avec la rhIL-1 $\beta$  à des concentrations de 5, 10 et 20 ng/mL durant 24 heures ou avec une concentration de 5 ng/mL de rhIL-1 $\beta$  durant des périodes de temps variant entre 6 et 24 heures, a provoqué une augmentation significative de la concentration en PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture. Cette augmentation de production de PGE<sub>2</sub> a été associée avec l'induction de l'expression des ARNm et des protéines COX-2 et mPGES-1.

Ces résultats démontrent que l'augmentation de production de PGE<sub>2</sub> dépendante de la rhIL-1 $\beta$  par les chondrocytes équins en culture en monocouche est associée à une augmentation de l'expression de la COX-2 et de la mPGES-1. Étant une enzyme au bas de la cascade de l'acide arachidonique, la mPGES-1 devient donc une cible thérapeutique intéressante dans l'élaboration de médicaments contre l'ostéoarthrose.

**Mots clés :** Chondrocyte; cartilage; ostéoarthrose; équin; cheval; maladie articulaire; mPGES-1; COX-2; PGE<sub>2</sub>.

## Abstract

Osteoarthritis, a degenerative pathology of the joint, is a serious disease in the horse racing industry. The implication of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis is well recognized and an important role is played by prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a metabolite of the arachidonic acid cascade. The aim of this study was to characterize expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) and regulation of PGE<sub>2</sub> production by equine articular chondrocytes.

Equine chondrocyte monolayer cultures from 7 adult horses were stimulated with different concentrations (2.5, 5, 10 and 20 ng/mL) of recombinant human interleukin-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ) for 24 hours and then with rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for 3, 6, 9, 12 and 24 hours. Concentration of PGE<sub>2</sub> in the media was measured by radioimmunoassay. After extraction, the regulation of COX-2 and mPGES-1 mRNA expression was studied by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay and Southern blot analysis. Western Blot analyses were performed on cellular extracts to characterize expression of COX-2 and mPGES-1 protein.

Stimulation with 5, 10 and 20 ng of rhIL-1 $\beta$ /mL for 24 hours or with rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for 6 to 24 hours caused a significant increase in PGE<sub>2</sub> concentrations in the culture media. The increase in prostaglandin production was associated with an induction of COX-2 and mPGES-1 transcripts and protein expression.

Collectively, results indicated that the rhIL-1 $\beta$ -dependent increase in PGE<sub>2</sub> production in equine chondrocytes in monolayer culture was associated with coordinated up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression. Because mPGES-1 is a downstream enzyme in the arachidonic acid cascade, it becomes an interesting therapeutic target for the treatment of osteoarthritis.

**Key words :** Chondrocyte; cartilage; osteoarthritis; equine; horse; joint disease; mPGES-1; COX-2; PGE<sub>2</sub>.

## Table des Matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Recension de la littérature.....</b>	<b>3</b>
I.1. <u>Le cartilage articulaire</u> .....	3
I.1.1. Anatomie du cartilage articulaire.....	3
I.1.2. Composition de la matrice extracellulaire.....	3
I.1.2.1. Le collagène.....	4
I.1.2.2. Les protéoglycanes.....	5
I.1.2.3. L'hyaluronane.....	6
I.1.3. Organisation structurale.....	6
I.2. <u>Le chondrocyte articulaire</u> .....	9
I.2.1. La structure moléculaire du chondrocyte.....	9
I.2.2. Le métabolisme du chondrocyte.....	9
I.2.3. Interactions entre chondrocytes et matrice extracellulaire.....	10
I.2.3.1. Synthèse matricielle.....	10
I.2.3.2. Dégradation matricielle.....	11
I.3. <u>Pathogénie de l'ostéoarthrose</u> .....	13
I.3.1. Introduction.....	13
I.3.2. Cytokines pro-inflammatoires.....	14
I.3.3. Cascade de l'acide arachidonique.....	17
I.3.3.1. Phospholipase.....	18

I.3.3.2. Lipoxygénase.....	19
I.3.3.3. Cyclo-oxygénase.....	20
I.3.3.4. Prostaglandine E synthétase.....	22
I.3.4. Prostaglandines.....	24
I.3.4.1. Prostaglandine E <sub>2</sub> et ostéoarthrose.....	25
I.4. <u>Culture de chondrocytes</u> .....	27
I.4.1. Introduction.....	27
I.4.2. Culture en monocouche.....	28
I.4.3. Phénomène de dédifférenciation des chondrocytes en culture.....	28
I.4.4. Avantages et inconvénients des cultures cellulaires.....	29
I.4.4.1. Avantages.....	29
I.4.4.1.1. Contrôle de l'environnement.....	29
I.4.4.1.2. Économies.....	30
I.4.4.2. Désavantages.....	30
I.4.4.2.1. Expertise.....	30
I.4.4.2.2. Quantité.....	30
I.4.5. Différences majeures entre les études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	30
I.4.6. Modèles <i>in vitro</i> d'ostéoarthrose.....	31
I.5. <u>Hypothèse et objectif</u> .....	33
<b>Chapitre II : Article .....</b>	<b>34</b>
II.1. <u>Summary</u> .....	36
II.2. <u>Introduction</u> .....	37
II.3. <u>Methods</u> .....	39
II.3.1. Source of tissues and cell culture.....	39
II.3.2. Study design.....	40
II.3.2.1. Experiment 1 .....	40
II.3.2.2. Experiment 2.....	40
II.3.3. PGE <sub>2</sub> measurement.....	40
II.3.4. Semiquantitative RT-PCR and Southern blot analyses.....	41



II.3.5. Western blot analyses.....	42
II.3.6. Statistical analyses.....	42
II.4. <u>Results</u> .....	44
II.4.1. Experiment 1 .....	44
II.4.1.1. IL-1 $\beta$ -dependent induction of PGE <sub>2</sub> production .....	44
II.4.1.2. IL-1 $\beta$ -dependent induction of COX-2 and mPGES-1 mRNA expression .....	44
II.4.2. Experiment 2.....	44
II.4.2.1. Time-dependent regulation of PGE <sub>2</sub> production .....	44
II.4.2.2. Time-dependent expression of COX-2 and mPGES-1 mRNA.....	45
II.4.2.3. Time-dependent expression of COX-2 and mPGES-1 proteins.....	45
II.5. <u>Discussion</u> .....	46
II.6. <u>Acknowledgements</u> .....	49
II.7. <u>Footnotes</u> .....	50
II.8. <u>References</u> .....	52
II.9. <u>Figure legends</u> .....	56
<b>Chapitre III : Discussion .....</b>	<b>61</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>66</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>67</b>

## Liste des tableaux

### Chapitre I

<b>Tableau I</b> – Différents types de collagène présents au sein du cartilage articulaire et leurs rôles respectifs	4
<b>Tableau II</b> – Facteurs importants dans la promotion de la synthèse de la matrice extracellulaire par les chondrocytes articulaires	11
<b>Tableau III</b> – Métallo-protéases matricielles importantes dans la promotion de la dégradation de la matrice extracellulaire par les chondrocytes articulaires	12
<b>Tableau IV</b> – Cytokines pro-inflammatoires les plus importantes (autres que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ ) et leurs effets possibles au niveau de l'articulation	15

## Liste des figures

### Chapitre I

- Figure 1** – Représentation schématique du réseau fibrillaire de collagène et des agrégats d'aggrécane– selon Poole *et al.* 2001 5
- Figure 2** –Représentation des différentes zones du cartilage articulaire humain adulte– selon Poole *et al.* 2001 7
- Figure 3** –Enzymes, substrats et produits clés dans la cascade de l'acide arachidonique– selon Robinson 1998 et Haeggstrom and Wetterholm 2002 18

### Chapitre II

- Figure 1** – Gel electrophoretogram of cyclooxygenase-2 (COX-2), microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation with various concentrations of recombinant human interleukin-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ). 57
- Figure 2**—Mean  $\pm$  SEM concentrations of PGE<sub>2</sub> obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation with rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) or without rhIL-1 $\beta$  (control). 58
- Figure 3**— Gel electrophoretogram of COX-2, mPGES-1, and GADPH obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation without ( - ) or with ( + ) rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for various periods. 59

**Figure 4**— Western blot analysis of COX-2 and mPGES-1 obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation without (-) or with (+) rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for 0, 12, or 24 hours.

60

## Liste des sigles et des abréviations

AINS	<b>Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien</b>
ARNm	<b>Acide RiboNucléique messenger</b>
BCP	<b>Basic Calcium Phosphate</b> (Phosphate basique de calcium)
BMP	<b>Bone Morphogenetic Protein,</b> (Protéine osseuse morphogénique)
cDNA	<b>complementary DeoxyriboNucleic Acid</b> (acide désoxyribonucléique complémentaire)
CO <sub>2</sub>	<b>Carbon diOxide</b> (dioxyde de carbone)
COX	<b>Cyclo-OXygénase</b>
COX-1	<b>Cyclo-OXygénase-1</b>
COX-2	<b>Cyclo-OXygénase-2</b>
cPGES	<b>cytosolic ProstaGlandin E Synthase</b> (Prostaglandine E synthétase cytosolique)
cPLA <sub>2</sub>	<b>cytosolic PhosphoLipase A<sub>2</sub></b> (Phospholipase A <sub>2</sub> cytosolique)
CS	<b>Chondroitin Sulfate</b> (Sulfate de chondroïtine)
CSF	<b>Colony-Stimulating Factor</b> (Facteur de croissance hématopoïétique)
FBS	<b>Fetal Bovine Serum</b> (Sérum de veau foetal)
FGF	<b>Fibroblast Growth Factor</b> (Facteur de croissance fibroblastique)
GAPDH	<b>GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase</b>
IGF-1	<b>Insulin-like Growth Factor-1</b> (Facteur de croissance insulino-mimétique-1)

IGFBP-	<b>Insuline-like Growth Factor-1 Binding Protein</b> (Protéine liant le facteur de croissance insulinomimétique-1)
IL	<b>InterLeukine</b>
IL-1	<b>InterLeukine-1</b>
IL-1 $\alpha$	<b>InterLeukine-1<math>\alpha</math></b>
IL-1 $\beta$	<b>InterLeukine-1<math>\beta</math></b>
IL-1RA	<b>InterLeukine-1 Receptor Antagonist</b> (Récepteur antagoniste de l'interleukine-1)
KS	<b>Keratan Sulfate</b> (Sulfate de kératane)
LIF	<b>Leukemic Inhibiting Factor</b> (Facteur inhibant les cellules leucémiques)
LO	<b>LipOxygénase</b>
LPS	<b>LipoPolySaccharide</b>
LT	<b>LeucoTriène</b>
MMP	<b>Matrix MetalloProteinase</b> (Métallo-protéase matricielle)
mPGES	<b>microsomal ProstaGlandin E Synthase</b> (Prostaglandine E synthétase microsomale)
mRNA	<b>messenger RiboNucleic Acid</b> (Acide ribonucléique messenger)
NSAID	<b>NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs</b> (Anti-inflammatoire non-stéroïdien)
PDGF	<b>Platelet-Derived Growth Factor</b> (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PG	<b>ProstaGlandine</b>
PGE <sub>2</sub>	<b>ProstaGlandine E<sub>2</sub></b>
PGES	<b>ProstaGlandin E Synthase</b> (Prostaglandine E synthétase)
PGH <sub>2</sub>	<b>ProstaGlandine H<sub>2</sub></b>

PLA <sub>2</sub>	<b>PhosphoLipase A<sub>2</sub></b>
reIL-1 $\beta$	<b>recombinant equine InterLeukine-1<math>\beta</math></b> Interleukine-1 $\beta$ recombinante équine
rhIL-1 $\beta$	<b>recombinant human InterLeukine-1<math>\beta</math></b> Interleukine-1 $\beta$ recombinante humaine
RIA	<b>RadioImmunoAssay</b> (Radioimmunoessai)
RNA	<b>RiboNucleic Acid</b> (Acide ribonucléique)
RT-PCR	<b>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</b> (Amplification en chaîne par polymérase-transcriptase inverse)
TGF- $\beta$	<b>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></b> (Facteur de croissance transformant- $\beta$ )
TIMP	<b>Tissue Inhibitor of MetalloProteinase</b> (Inhibiteur tissulaire des métallo-protéases)
TNF- $\alpha$	<b>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></b> (Facteur onconécrosant- $\alpha$ )
TXA <sub>2</sub>	<b>ThromboXane A<sub>2</sub></b>
Type II sPLA <sub>2</sub>	<b>Type II secretory PhosphoLipase A<sub>2</sub></b> (Phospholipase A <sub>2</sub> sécrétoire de type II)

## Remerciements

*Dr Sheila Laverty, directrice*

Mille mercis pour toutes ces belles années passées à travailler à vos côtés. Vous avez été comme une mère pour moi, un guide par jours ensoleillés comme par jours de pluie. Vos conseils, autant sur le plan personnel que professionnel, m'ont mené jusqu'au bout du chemin parfois difficile de la maîtrise et de la résidence en chirurgie équine. Encore merci pour votre générosité, votre énergie, votre patience, votre disponibilité et vos encouragements dans les temps difficiles. « Every cloud has a silver lining » Je ne l'oublierai jamais...♣

*Dr Jean Sirois, codirecteur*

Sincères remerciements pour votre professionnalisme, votre bonne humeur et votre précieuse aide dans toutes les étapes de ma maîtrise. Merci également de m'avoir accordé plusieurs fois votre précieux temps lors de mes visites périodiques inattendues.

*Dr André Bisailon, président-rapporteur*

Pour vos conseils et le bonheur que j'ai eu à partager un cours d'anatomie avec vous, merci. Toute ma reconnaissance également pour avoir gentiment accepté de présider le jury d'évaluation.

*Dr Christine Théoret, membre du jury*

Pour votre aide, vos conseils et pour avoir accepté de participer au jury d'évaluation.

*Mme Hélène Richard et Nadine Bouchard*

Pour votre patience, autant au laboratoire que devant un ordinateur, merci. Également pour votre temps, votre dévouement et tout le plaisir que nous avons eu à travailler ensemble.

*Dr Clément Bisailon et son équipe,*

Merci beaucoup pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide dans la récolte d'échantillons.

Un merci tout particulier à mon mari Patrick. Ton amour toujours grandissant, ta patience, ta générosité, tes conseils et ton aide précieuse ont su m'aider à devenir ce que je suis maintenant. Merci

Merci à ma famille, mes parents, ma marraine, pour votre amour, votre présence et votre confiance.



## Introduction

L'ostéoarthrose est une maladie dégénérative se caractérisant par la destruction progressive du cartilage articulaire. Cette pathologie touche plusieurs espèces animales, incluant l'homme et revêt une importance particulière chez le cheval. En effet, l'ostéoarthrose est responsable de pertes économiques importantes dans l'industrie des courses, forçant plusieurs jeunes athlètes équins à terminer leur carrière prématurément.

Plusieurs études concernant la pathogénie de l'ostéoarthrose ont démontré une importance majeure de l'inflammation dans l'initiation et la progression de la maladie. Suivant une blessure cellulaire, pouvant survenir au niveau de tous les tissus présents au sein d'une articulation mais touchant le plus souvent le cartilage articulaire, il y a synthèse et relâche de molécules pro-inflammatoires par les cellules lésées. Ces différentes molécules, parmi lesquelles se retrouvent les cytokines, ont pour effet la stimulation des autres cellules articulaires. Concomitamment se met en place un ensemble de cascades enzymatiques ayant pour effet de favoriser le catabolisme de la matrice cartilagineuse au détriment de son anabolisme.

Parmi les cascades enzymatiques stimulées, nous retrouvons celle de l'acide arachidonique conduisant à une augmentation de synthèse de la prostaglandine  $E_2$  ( $PGE_2$ ), un écosanoïde pro-inflammatoire. La  $PGE_2$  possède le pouvoir de mener les chondrocytes à l'apoptose, favorise la synthèse de métallo-protéases matricielles (MMP) et la dégradation des composants matriciels. Pouvant également causer la résorption osseuse et la formation d'ostéophytes, elle est considérée comme d'importance majeure dans la progression des lésions d'ostéoarthrose.

Les enzymes soupçonnées comme étant directement responsables de la synthèse de la  $PGE_2$  en quantité pathologique sont la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), transformant l'acide arachidonique en prostaglandine  $H_2$  ( $PGH_2$ ), suivi par la prostaglandine synthétase microsomale-1 (mPGES-1), transformant cette dernière en  $PGE_2$ . Se trouvant en aval de cette cascade et n'étant responsable que de la production de la  $PGE_2$ , la mPGES-1 devient donc une cible thérapeutique intéressante dans le développement de médicaments contre l'ostéoarthrose entraînant moins d'effets secondaires.

Certaines études *in vitro* ont démontré une co-induction de la COX-2 et de la mPGES-1 chez des chondrocytes de plusieurs espèces animales en réponse à des stimulations pro-inflammatoires. N'ayant jamais été démontré au sujet de chondrocytes équins, l'objectif de notre étude est de caractériser l'expression de la COX-2 et de la mPGES-1, ainsi que la régulation de la production de PGE<sub>2</sub>, par des chondrocytes équins normaux *in vitro* et ce, suite à une stimulation pro-inflammatoire par l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

# **Chapitre I : Recension de la littérature**

## **I.1. Le cartilage articulaire**

### **I.1.1. Anatomie du cartilage articulaire**

Le cartilage hyalin recouvre l'os sous-chondral au niveau des articulations synoviales (Dewire and Einhorn 2001; Poole *et al.* 2001). Les interactions précisément contrôlées entre le cartilage articulaire et les tissus environnants permettent le mouvement des articulations, tout en minimisant leur usure et leur détérioration (Dewire and Einhorn 2001). Le cartilage articulaire est composé principalement d'eau (70% chez l'adulte, 80% chez le nouveau-né) qui est contenue dans une matrice extracellulaire bien organisée (Todhunter 1996). La proportion en eau du cartilage est plus importante en superficie de celui-ci et diminue avec la profondeur, en s'approchant de l'os sous-chondral (Poole 2001). La principale cellule présente au sein du cartilage et qui est responsable du renouvellement de la matrice cartilagineuse est le chondrocyte. Ce dernier représente environ 1 à 12% du volume total en matière sèche du cartilage (Todhunter 1996). De par le fait que le cartilage ne contient aucune innervation, les signaux nocicepteurs provenant de dommages qui lui sont infligés ne sont pas transmis directement par celui-ci (Kuettner and Thonar 1998). De plus, le cartilage ne contient aucune vascularisation ni drainage lymphatique (Todhunter 1996), l'apport en nutriments et l'élimination des déchets des chondrocytes se faisant uniquement via diffusion à travers la matrice cartilagineuse (Kuettner and Thonar 1998).

### **I.1.2. Composition de la matrice extracellulaire**

Le cartilage articulaire est composé de plusieurs molécules, mais les deux composants principaux sont le collagène et les protéoglycanes. Le collagène représente 15 à 25% du poids total du cartilage et 50% de son poids en matière sèche; les protéoglycanes, quant à eux, constituent 10% du poids total et 25% de son poids en matière sèche (Poole 2001).

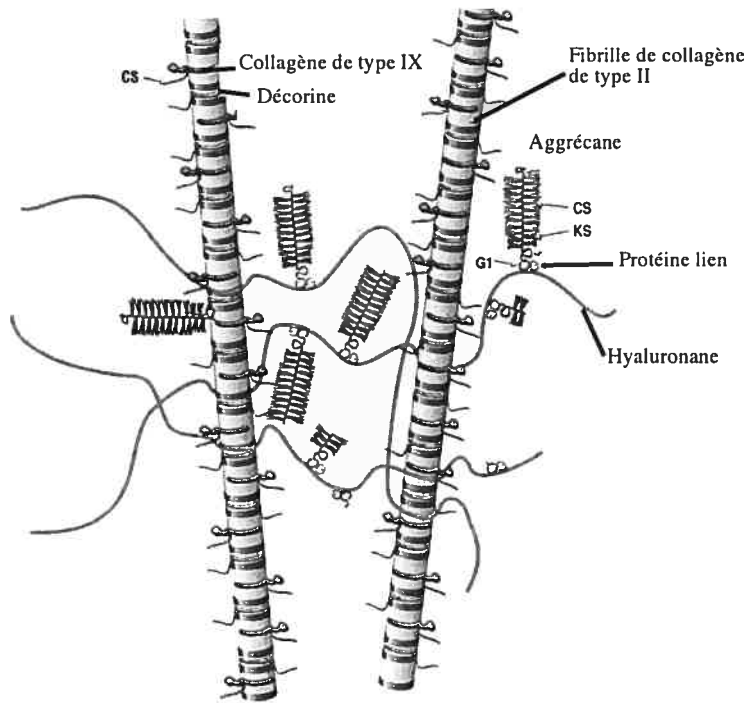
### I.1.2.1. Le collagène

Le cartilage articulaire est composé de plusieurs types de collagène, classés en ordre décroissant d'abondance au sein de la matrice extracellulaire: type II, XI, IX, VI, X, XII et XIV (se reporter au tableau I) (Poole 2001).

Type	% du collagène total	Rôles	Références
<b>II</b>	85-90	Formation des fibrilles de collagène Résistance à la traction du cartilage Maintien du volume et de la forme du cartilage	(Kuettner and Thonar 1998; Poole <i>et al.</i> 2001)
<b>XI</b>	2-3	Morphogenèse du cartilage Formation des fibrilles de collagène	(Kuettner and Thonar 1998; Sandell and Hering 2001)
<b>IX</b>	1	Organisation et résistance à la déformation de la matrice extracellulaire	(Todhunter 1996; Kuettner and Thonar 1998; Poole 2001)
<b>VI</b>	Traces	Liaison entre les fibrilles de collagène et la surface cellulaire	(Todhunter 1996)
<b>X</b>	Traces	Structuration de la matrice extracellulaire Déposition de minéraux dans la matrice calcifiée	(Poole <i>et al.</i> 2001; Sandell and Hering 2001)
<b>XII</b> <b>XIV</b>	Traces	Participation à la stabilisation du cartilage	(Gregory <i>et al.</i> 2001; Poole 2001)

**Tableau I :** Différents types de collagène présents au sein du cartilage articulaire et leurs rôles respectifs.

Le collagène de type II est le plus abondant au sein du cartilage hyalin, (se reporter à la figure 1 et au tableau I) (Todhunter 1996; Kuettner and Thonar 1998). C'est le réseau formé par ce type de collagène qui est responsable de la force du cartilage et de sa capacité à conserver son volume et sa forme (Kuettner and Thonar 1998). Le collagène de type II est organisé en fibrilles, dont le diamètre varie selon la zone de cartilage où elles se trouvent, allant de 20 nm dans la zone superficielle, à presque 120 nm dans la zone profonde (Poole *et al.* 2001). Ces fibrilles sont formées par des molécules de tropocollagène qui est l'unité de base du collagène et qui est composé d'une triple hélice de chaînes alpha identiques (Poole 2001; Poole *et al.* 2001).



**Figure 1 :** Représentation schématique du réseau fibrillaire de collagène et des agrégats d'aggrécane – selon (Poole *et al.* 2001).

Le taux de renouvellement du collagène est très lent (près de 350 ans chez l'homme). Ce long taux de renouvellement est attribuable à la configuration structurale des fibrilles de collagène : une fois que les liaisons covalentes sont formées à l'intérieur et entre les molécules et ce, au sein de la fibrille, les sites disponibles pour le clivage enzymatique se font rares (Todhunter 1996).

#### I.1.2.2. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des macromolécules qui remplissent le réseau tridimensionnel de fibrilles de collagène (Kuettner and Thonar 1998). Ils sont formés d'une ou de plusieurs chaînes de glycosaminoglycane liées de façon covalente à une protéine centrale (protéine corps) (Todhunter 1996). Les glycosaminoglycanes sont formés de deux régions : une région de jonction par laquelle la molécule est fixée à la protéine centrale (sauf l'hyaluronane), et une région composée d'une répétition de disaccharides, très hétérogène selon le glycosaminoglycane en question (Todhunter 1996).

Le protéoglycane présent en quantité majeure dans le cartilage articulaire est l'aggrécane et représente environ 90% de la masse totale des protéoglycanes (Kuettner and Thonar 1998). Il est composé de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes différents: le sulfate de chondroïtine (CS) et le sulfate de kératane (KS) (Kuettner and Thonar 1998; Poole *et al.* 2001). L'aggrécane forme de larges agrégats qui sont à leur tour fixés à l'hyaluronane par leur domaine globulaire G1 et stabilisés par la protéine lien (Todhunter 1996; Poole *et al.* 2001) (se reporter à la figure 1). C'est lui qui est responsable de l'hydratation importante de la matrice cartilagineuse, bien que cet état d'hydratation soit limité par la structure de collagène qui l'empêche de prendre pleine expansion (Poole 2001). Par ce phénomène, l'aggrécane se trouve alors partiellement hydraté, ce qui lui confère un gradient de pression d'oedème important et donne ainsi au cartilage sa capacité à résister aux forces de compression et de déformation (Poole 2001; Poole *et al.* 2001).

Le taux de renouvellement des protéoglycanes est d'environ 1800 jours chez l'homme. De plus, il existe un point de non-retour concernant le taux de perte de protéoglycanes au sein du cartilage, au-delà duquel des dommages dégénératifs irréversibles prennent place (Todhunter 1996).

### **I.1.2.3. L'hyaluronane**

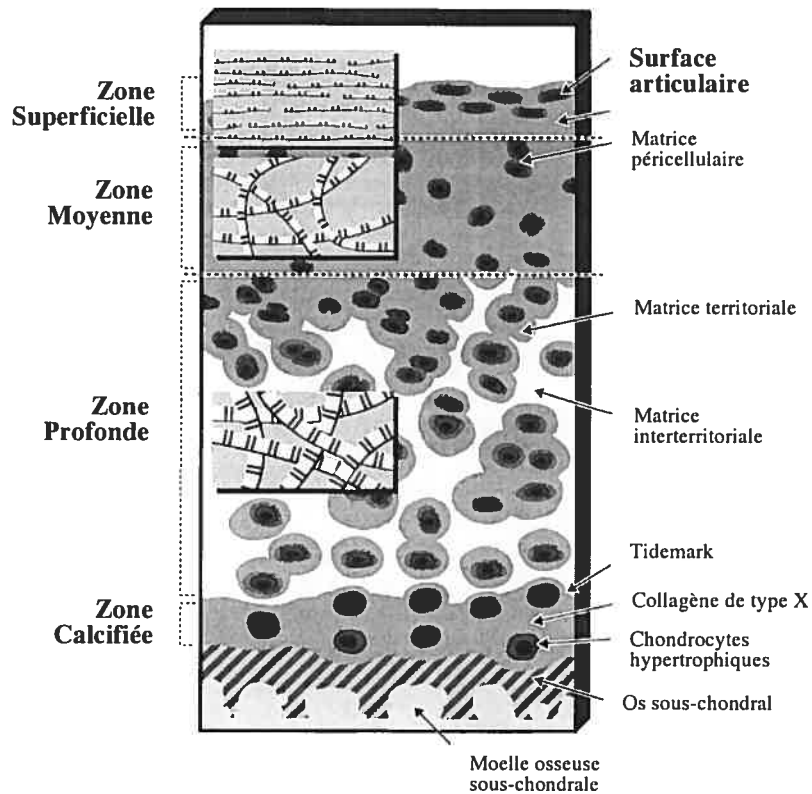
La molécule d'hyaluronane est responsable de l'organisation macromoléculaire et de la rétention de l'aggrécane au sein de la matrice extracellulaire du cartilage (Poole 2001). L'hyaluronane se fixe directement ou indirectement aux fibrilles de collagène et se fixe également aux chondrocytes via leurs récepteurs cellulaires de surface (Poole 2001; Poole *et al.* 2001). Il s'agit d'un glycosaminoglycane extracellulaire de haut poids moléculaire composé de plusieurs unités d'acétylglucosamine et d'acide glucuronique (Kuettner and Thonar 1998).

Plusieurs autres molécules entrent dans la composition de la matrice extracellulaire du cartilage hyalin, elles sont décrites ailleurs (Poole 2001).

### **I.1.3. Organisation structurale**

Le cartilage articulaire est organisé d'une manière reflétant les forces de tension, de compression, ainsi que les stress de déchirure exercés sur ce tissu lors des

mouvements physiologiques répétés des articulations (Poole 2001). Le cartilage articulaire se divise en quatre zones (se reporter à la figure 2): trois non calcifiées superficielles et une zone calcifiée profonde, en contact avec l'os sous-chondral (Todhunter 1996).



**Figure 2 :** Représentation des différentes zones du cartilage articulaire humain adulte - selon (Poole et al. 2001).

La zone superficielle, aussi dénommée tangentielle ou zone I, renferme des chondrocytes en forme de disque, orientés parallèlement à la surface articulaire et c'est dans cette zone qu'on les rencontre en plus grand nombre (Kuettner and Thonar 1998; Poole *et al.* 2001). Ces chondrocytes possèdent des propriétés de synthèse de matrice différentes des chondrocytes des zones plus profondes, étant exposés à des forces physiologiques plus puissantes de par leur position à la surface de contact articulaire (Poole 2001). Dans cette zone, les fibrilles de collagène sont fines, organisées de façon tangentielle à la surface articulaire et parallèles les unes aux autres (Poole 2001; Poole

*et al.* 2001) (se reporter à la figure 2). C'est dans cette zone que l'aggrécane se retrouve en quantité la plus faible (Poole 2001; Poole *et al.* 2001).

La zone moyenne quant à elle, dénommée également zone intermédiaire, de transition ou zone II, renferme des chondrocytes plutôt sphériques, entourés par une matrice extracellulaire extensive (Poole 2001; Poole *et al.* 2001). Les chondrocytes au sein de cette zone sont parfois organisés en petits groupes (Kuettner and Thonar 1998). Les fibrilles composant la matrice cartilagineuse sont organisées en une structure tridimensionnelle, les fibrilles les plus larges étant perpendiculaires à la surface articulaires et les plus petites, enchevêtrées parmi elles (Todhunter 1996) (se reporter à la figure 2). À ce niveau, la matrice extracellulaire est riche en aggrécane (Poole *et al.* 2001).

La zone profonde, aussi appelée zone radiale ou zone III, renferme la concentration la plus pauvre en chondrocytes, et ces derniers, de forme ellipsoïde, sont la plupart du temps organisés en grappes, avec leur axe orienté perpendiculairement à la surface articulaire (Kuettner and Thonar 1998). Dans cette zone, la matrice cartilagineuse est composée de larges fibrilles qui sont orientées principalement de façon perpendiculaire, tressant une mèche plus serrée qu'au niveau des autres couches matricielles (Todhunter 1996) (se reporter à la figure 2). Cette zone profonde renferme une quantité maximale d'aggrécane, mais minimale de collagène (Poole *et al.* 2001).

Adjacente à la zone profonde se trouve la zone calcifiée ou zone IV. La jonction entre la zone profonde et la zone calcifiée se dénomme le « tidemark » (se reporter à la figure 2). Cette zone assure la liaison entre le cartilage hyalin et l'os sous-chondral, comportant à la fois des caractéristiques propres aux deux zones (Poole 2001). Quelques chondrocytes présents dans cette zone sont nécrotiques, mais la plupart sont viables, présentent un phénotype hypertrophique et synthétisent du collagène de type X (Kuettner and Thonar 1998; Poole *et al.* 2001). La matrice cartilagineuse composant cette zone est similaire en tout point à celle de la zone profonde, mais est imprégnée de cristaux d'hydroxyapatite (Todhunter 1996).



## **I.2. Le chondrocyte articulaire**

### **I.2.1. La structure moléculaire du chondrocyte**

Le chondrocyte est une cellule hautement spécialisée, ayant la capacité de synthétiser les différents composants de la matrice extracellulaire, les différentes molécules pro-inflammatoires et les enzymes pouvant détruire ces mêmes composants matriciels (Sledge 1994). Les chondrocytes se retrouvent relativement isolés dans des lacunes présentes au sein de la matrice extracellulaire, vivant seuls, en paires ou en petits groupes (Sledge 1994). Ils occupent seulement 0,4 à 2% du volume total du cartilage hyalin chez l'adulte et possèdent un pouvoir mitotique très limité, d'où la faible possibilité de régénérescence cartilagineuse lors de dommages (Sledge 1994; Poole *et al.* 2001).

Au sein du chondrocyte, la synthèse de protéoglycanes se produit dans les ribosomes et dans l'appareil de Golgi (Farquhar and Palade 1998), tandis que l'assemblage des molécules de collagène s'effectue majoritairement dans le réticulum endoplasmique rugueux (Pacifci and Iozzo 1988; Dewire and Einhorn 2001). Le cytosquelette du chondrocyte consiste en un réseau tridimensionnel formé de microfilaments d'actine, de microtubules de tubuline et de filaments intermédiaires (Zwicky and Baici 2000), qui participent aux fonctions de sécrétion et d'endocytose (Langelier *et al.* 2000; Zwicky and Baici 2000), de transport cytoplasmique (Jortikka *et al.* 2000) et d'intégration mécanique de l'espace cellulaire, respectivement (Langelier *et al.* 2000). La membrane cellulaire du chondrocyte, comme celle de toutes les cellules de mammifères, contient des phospholipides membranaires qui, après transformation en acide arachidonique, servent de substrat pour les différentes enzymes impliquées dans la cascade de l'acide arachidonique.

### **I.2.2. Le métabolisme du chondrocyte**

Les chondrocytes sont sensibles aux changements dans la composition de la matrice extracellulaire qui résultent d'événements cataboliques ou de stimulus physiques (May *et al.* 1992a; Dewire and Einhorn 2001). Les chondrocytes sont des cellules capables de vivre dans des conditions relativement hypoxiques (Kuettner and Thonar 1998) et elles contiennent des concentrations élevées de dépôts de glycogène, le glucose étant fondamentalement important dans le métabolisme énergétique de celui-ci

(Dewire and Einhorn 2001; Windhaber *et al.* 2003). Les chondrocytes utilisent principalement la glycolyse anaérobie pour la génération de phosphates hauts en énergie, ces derniers pouvant utiliser des agents oxydants autre que l'oxygène pour assurer cette fonction (Dewire and Einhorn 2001; Lee and Urban 2002). En fait, leur consommation en oxygène correspond à 2% de celle des tissus vascularisés, mais son utilisation apporte tout de même au chondrocyte une fraction de ses besoins énergétiques totaux (Todhunter 1996).

### **I.2.3. Interactions entre chondrocytes et matrice extracellulaire**

À chaque étape de la croissance, du développement et de la maturation, les taux relatifs de dégradation et de synthèse de matrice sont ajustés pour atteindre un résultat net de croissance, de remodelage ou d'équilibre (Todhunter 1996). La façon par laquelle le chondrocyte orchestre le taux de renouvellement de la matrice cartilagineuse est encore méconnue, mais lors de maladie articulaire dégénérative, il y a déséquilibre entre la synthèse et la dégradation matricielle et ce, en faveur de cette dernière (Henrotin and Reginster 1999).

#### **I.2.3.1. Synthèse matricielle**

Durant la croissance et le développement, il y a une synthèse active de matrice extracellulaire. Il y a production de nouveau collagène, protéoglycanes et autres molécules. La croissance s'accompagne aussi du renouvellement de ces molécules lors du remodelage du cartilage. Une fois la croissance arrêtée, la production de molécules matricielles est beaucoup diminuée et la proportion de chondrocyte chute également de façon importante (Poole 1996). Les chondrocytes perdent donc leur capacité de synthèse avec le vieillissement (Morris and Treadwell 1994; McIlwraith 1996) et leur réponse aux facteurs de croissance présents dans le sérum diminue dramatiquement (Kuettner and Thonar 1998; Poole 2001).

Que ce soit lors de la croissance ou lors de la réparation de lésions cartilagineuses, plusieurs facteurs de croissance et autres promoteurs sont impliqués dans l'augmentation de la synthèse matricielle par le chondrocyte (se reporter au tableau II).

Facteur	Nom	Rôle	Références
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Facteur de croissance transformant- $\beta$	Favorise l'expression du phénotype et la prolifération des chondrocytes, Favorise la synthèse de collagène et de protéoglycanes Diminue la dégradation des protéoglycanes	(Kuettnner and Thonar 1998; Lotz 2001; Poole 2001)
<b>FGF</b>	Facteur de croissance fibroblastique	Favorise la mitose et la synthèse de protéoglycanes Est important pour la chondrogenèse	(Pelletier <i>et al.</i> 2001; Poole 2001)
<b>IGF-1</b>	Facteur de croissance insulino-mimétique -1	Induit la synthèse de collagène et de protéoglycanes Favorise la prolifération cellulaire	(Palmer and Bertone 1994; Martel-Pelletier <i>et al.</i> 1998; Poole 2001)
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	Favorise la synthèse de protéoglycanes et la division cellulaire	(Kuettnner and Thonar 1998; Poole 2001)
<b>BMP</b>	Protéine osseuse morphogénique	Favorise la synthèse de collagène et de protéoglycanes Diminue la dégradation des protéoglycanes	(Pelletier <i>et al.</i> 2001; Poole 2001)

**Tableau II :** Facteurs importants dans la promotion de la synthèse de la matrice extracellulaire par les chondrocytes articulaires.

### I.2.3.2. Dégradation matricielle

Le programme catabolique du chondrocyte est induit par des stimulus pro-inflammatoires, qu'il s'agisse des différentes cytokines, des métabolites de la cascade de l'acide arachidonique ou de d'autres molécules, et se caractérise par la sécrétion de protéinases, la suppression de synthèse de matrice extracellulaire et la réduction du nombre de chondrocytes (Blanco *et al.* 1999). Les MMP sont des enzymes clés dans les processus de dégradation du cartilage articulaire que l'on rencontre entre autres lors d'ostéoarthrose (se reporter au tableau III). Au sein du cartilage normal, les MMP sont faiblement exprimées, ne servant qu'au remodelage physiologique de celui-ci. Par contre, lors de maladies dégénératives, il se produit un déséquilibre entre la quantité d'inhibiteurs tissulaires des métallo-protéases (TIMP) et la quantité de MMP elles-mêmes, résultant en une déficience relative en ces inhibiteurs (Todhunter 1996). De plus, suite à des stimulations pro-inflammatoires, il y a activation des MMP qui sont normalement sécrétées sous leur forme inactive (Clegg and Carter 1999).

<b>MMP</b>	<b>Synonymes</b>	<b>Substrats</b>	<b>Références</b>
<b>1</b>	Collagénase-1, Interstitielle	Collagène de types I, II, III, VII, X, IX et de type II dénaturé Aggrécane	(McIlwraith 1996; Poole 2001)
<b>2</b>	Gélatinase A	Collagène de types IV, X et de type II dénaturé Aggrécane	(Kuettner and Thonar 1998; Poole 2001)
<b>3</b>	Stromélysine-1	Aggrécane Collagène de types IX et XI Procollagène Protéine lien	(McIlwraith 1996; Poole 2001)
<b>7</b>	Matrilysine	Aggrécane	(Poole 2001)
<b>8</b>	Collagénase-2, Neutrophilique	Collagène de type II Aggrécane	(Couchman 2001; Poole 2001)
<b>9</b>	Gélatinase B	Collagène de types IV, V et de type II dénaturé	(Cawston 1998; Poole 2001)
<b>10</b>	Stromélysine-2	Aggrécane Collagène de types IX et XI Procollagène Protéine lien	(Poole 2001)
<b>11</b>	Stromélysine-3	Protéolyse générale	(Poole 2001)
<b>13</b>	Collagénase-3	Collagène de type II Aggrécane	(Richardson and Dodge 2000; Poole 2001)
<b>14</b>	MMP membranaire de type 1	Collagène de type II Aggrécane	(Poole 2001)

**Tableau III :** Métallo-protéases matricielles importantes dans la promotion de la dégradation de la matrice extracellulaire par les chondrocytes articulaires.

Faisant aussi partie des MMP nous retrouvons les aggrécanasés : l'aggrécanasé-1 ou ADAMTS-4 et l'aggrécanasé-2 ou ADAMTS-5 (anciennement dénommée ADAMTS-11). Ces deux protéases ont pour fonction la dégradation de l'aggrécane, comme leur nom le suggère (Poole 2001). Les aggrécanasés seraient peut-être les premières responsables de la destruction de la matrice cartilagineuse en causant la destruction des protéoglycanes attachés aux fibrilles de collagène, favorisant par le fait même l'action des collagénases (Kuettner and Thonar 1998; Couchman 2001; Nagase and Kashiwagi 2003). Cependant, parce que les aggrécanasés sont des MMP tout récemment découvertes, une information très limitée est disponible au sujet de leur signification biologique et pathologique au sein du cartilage articulaire (Nagase and Kashiwagi 2003).

### **I.3. Pathogénie de l'ostéoarthrose**

#### **I.3.1. Introduction**

Au sein de chacun des composants d'une articulation saine, il existe un équilibre précaire entre les phénomènes anaboliques et cataboliques, résultant en un maintien d'un environnement articulaire normal (Pelletier *et al.* 2001). Cependant, comme tout tissu vivant, le cartilage articulaire peut être la cible de maladie dégénérative, caractérisée par la prédominance des phénomènes cataboliques et menant éventuellement à la destruction du cartilage. L'ostéoarthrose, une maladie dégénérative articulaire, se caractérise par la destruction progressive de la matrice cartilagineuse, menant à la fibrillation de cette dernière et causant l'apparition d'ulcérations et de fissures, pour finalement conduire à la perte partielle ou totale de la surface articulaire (Martel-Pelletier 2004).

Chez le cheval, l'ostéoarthrose est une maladie fréquente et ayant un impact majeur sur les performances athlétiques. Cette pathologie articulaire est responsable de la fin de carrière prématurée de plusieurs jeunes chevaux de course et ce, à travers le monde, entraînant ainsi d'importantes pertes économiques au sein de l'industrie équine. Le maintien d'une fonction articulaire normale est donc une préoccupation importante pour le médecin vétérinaire en pratique équine (Todhunter 1996).

Bien que l'étiologie exacte de l'ostéoarthrose soit encore méconnue, il est maintenant reconnu que celle-ci est multiple et inclut des facteurs mécaniques, biochimiques et génétiques (Martel-Pelletier 2004). Contrairement aux humains chez qui on associe le plus souvent l'ostéoarthrose au phénomène de vieillissement, le patient équin affligé par cette pathologie est souvent beaucoup plus jeune (McIlwraith 1996). Que ce soit suite à un trauma ou suite à de multiples traumas répétés d'envergure moindre au niveau d'une ou de plusieurs articulations et quelle qu'en soit la cause (performance sportive ou autre), il y a installation d'un phénomène inflammatoire impliquant tous les tissus au sein de l'articulation (cartilage, membrane synoviale, os sous-chondral, etc) (Palmer and Bertone 1994). Il se produit donc une relâche de molécules pro-inflammatoires par les différentes cellules articulaires, en particulier par les chondrocytes, ayant comme conséquence l'activation de plusieurs cascades enzymatiques donc celle de l'acide arachidonique, qui est responsable de la production d'un écosanoïde pro-inflammatoire important, la PGE<sub>2</sub>. Parallèlement se produit

également une augmentation de la synthèse de protéases, comme les MMP, ainsi que d'autres molécules responsables de la dégradation enzymatique de la matrice cartilagineuse (McIlwraith 1996). Bien entendu, des mécanismes physiologiques de guérison se mettent aussi en place, mais se trouvent rapidement dépassés par les phénomènes cataboliques, l'industrie équine ne permettant que rarement un repos adéquat à leurs athlètes pour favoriser la guérison et la diminution de l'inflammation articulaire (Palmer and Bertone 1994). Ainsi, le phénomène se poursuit jusqu'à l'apparition d'ostéoarthrose, menant éventuellement à la perte de fonction de l'articulation et à la fin de carrière du coureur équin.

### **I.3.2. Cytokines pro-inflammatoires**

Au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré l'implication de différents médiateurs de l'inflammation dans les processus dégénératifs caractérisant l'ostéoarthrose (Towle *et al.* 1997; Melchiorri *et al.* 1998; Abramson *et al.* 2001; Pelletier *et al.* 2001b; Hedbom and Hauselmann 2002; Martel-Pelletier 2004). Plus précisément, les cytokines pro-inflammatoires ont été impliquées dans le développement et la progression de la maladie (Hedbom and Hauselmann 2002). Une cytokine est une hormone tissulaire, soit une petite protéine et/ou polypeptide qui est responsable d'agir comme messenger permettant aux cellules de communiquer entre-elles. Les cytokines exercent leur effet biologique de différentes façons. Elles peuvent être relâchées en circulation et affecter des cellules distantes, donc selon un mode que l'on nomme endocrine. Elle peuvent également affecter des cellules adjacentes à la cellule productrice et donc stimuler ces cellules de façon paracrine ou encore opter pour le mode de stimulation autocrine où la cellule productrice est elle-même stimulée par ses propres cytokines (McIlwraith 1996).

Le plus souvent, les cytokines ne sont pas exprimées de façon constitutive mais plutôt suite à une stimulation de la cellule productrice (Steinmeyer 2004). Elles sont soit pro-inflammatoires, soit anti-inflammatoires, même si certaines peuvent également se classer dans les deux catégories, tout dépendant de leur localisation tissulaire, de leur concentration et du type de cellule stimulée par celles-ci (Martel-Pelletier *et al.* 1999). Cependant, le rôle exact de la plupart de ces cytokines dans la pathogénie de l'ostéoarthrose n'a pas encore été clairement établi (Hedbom and Hauselmann 2002).

Les cytokines pro-inflammatoires incluent les interleukines, les facteurs onconécrosants, les interférons et les facteurs de croissance hématopoïétiques (CSF) (Hedbom and Hauselmann 2002). Notons parmi ces dernières les plus importantes : les interleukines (IL)-1, -6, -8, -17 et -18, le facteur onconécrosant- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et le facteur inhibant les cellules leucémiques (LIF) (se reporter au tableau IV) (Pelletier *et al.* 2001b; Hedbom and Hauselmann 2002; Martel-Pelletier 2004; Steinmeyer 2004). Le groupe des cytokines anti-inflammatoires quant à lui se compose des IL-4, -10, -11 et -13 et du récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1RA) (Pelletier *et al.* 2001b; Steinmeyer 2004) et elles sont décrites en détails ailleurs (Martel-Pelletier *et al.* 1999; Fernandes *et al.* 2002).

IL	Effets au niveau de l'articulation	Références
6	Amplification de la production de cytokines et de MMP Induction de la production de TIMP	(Platt 1996a; Martel-Pelletier <i>et al.</i> 1999; Flannery <i>et al.</i> 2000; Pelletier <i>et al.</i> 2001)
8	Chimiotaxie des neutrophiles Induction de la production d'enzymes lysosomales et de cytokines	(Matsukawa <i>et al.</i> 1995; Platt 1996a; Martel-Pelletier <i>et al.</i> 1999)
17	Induction de la production de cytokines et de MMP Stimulation de l'expression de la COX-2 Inhibition de la synthèse de protéoglycanes et de collagène	(Shalom-Barak <i>et al.</i> 1998; Honorati <i>et al.</i> 2002; Moseley <i>et al.</i> 2003; Sylvester <i>et al.</i> 2004)
18	Induction de la relâche de protéoglycanes Induction de la synthèse des MMP	(Pelletier <i>et al.</i> 2001; Joosten <i>et al.</i> 2004; Dai <i>et al.</i> 2005)
LIF	Induction de la production de cytokines et de MMP Stimulation de la dégradation des protéoglycanes	(Carroll and Bell 1993; Villiger <i>et al.</i> 1993; Henrotin <i>et al.</i> 1996; Pelletier <i>et al.</i> 2001)

**Tableau IV :** Cytokines pro-inflammatoires les plus importantes (autres que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ ) et leurs effets possibles au niveau de l'articulation.

Les cytokines pro-inflammatoires les plus importantes dans le phénomène d'ostéoarthrose sont l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Blanco 1999; Pelletier *et al.* 2001; Pelletier *et al.* 2001b; Poole and Howell 2001; Hedbom and Hauselmann 2002; Martel-Pelletier

2004). L'IL-1 $\beta$  serait la cytokine majoritairement impliquée dans la destruction du cartilage alors que le TNF- $\alpha$  pour sa part, serait responsable de la perpétuation de l'inflammation retrouvée lors d'ostéoarthrose (Pelletier *et al.* 2001). Ensemble, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  démontrent une synergie dans le processus de destruction cartilagineuse (Goldring 2000).

Le TNF- $\alpha$  est un médiateur important dans la dégradation de la matrice cartilagineuse et une cytokine primordiale dans la génération de l'inflammation intra-articulaire rencontrée lors d'ostéoarthrose (Pelletier *et al.* 2001). Il est retrouvé en quantité augmentée au niveau de la membrane synoviale d'articulations où l'on retrouve des dommages cartilagineux, ainsi qu'au niveau des chondrocytes et de la matrice cartilagineuse (Moos *et al.* 1999). Son expression se retrouve même chez les patients démontrant seulement un début d'ostéoarthrose (Smith *et al.* 1997). De plus, le TNF- $\alpha$  est capable de causer, chez des chondrocytes articulaires, une diminution dans le taux de transcription de l'aggrécane (Dodge *et al.* 1998). En plus de provoquer une diminution dans la production et l'incorporation matricielle des collagènes de type II et de type XI (Lefebvre *et al.* 1990; Richardson and Dodge 2000; Seguin and Bernier 2003), il possède la capacité d'induire la synthèse de certaines MMP par des chondrocytes en culture (Jasser *et al.* 1994). En ce qui concerne la fonction chondrocytaire elle-même, le TNF- $\alpha$ , aux doses retrouvées *in vivo* lors d'ostéoarthrose sévère, est capable de diminuer la viabilité, d'induire l'apoptose et d'inhiber la prolifération des chondrocytes (Schuerwegh *et al.* 2003). Finalement, il a été démontré que le TNF- $\alpha$  peut induire l'expression de la COX-2 (Morisset *et al.* 1998), une enzyme essentielle menant à la production de la PGE<sub>2</sub>, comme il en sera question plus loin dans ce mémoire.

Quant à elle, l'IL-1 est la cytokine pro-inflammatoire par excellence que l'on rencontre lors d'ostéoarthrose. L'IL-1 est un peptide qui comporte deux formes reliées entre-elles, mais également distinctes : l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  (Platt 1996a). Chez le cheval, l'IL-1 $\beta$  a été démontrée beaucoup plus active que l'IL-1 $\alpha$  en ce qui regarde la production de PGE<sub>2</sub> par les cellules articulaires (May *et al.* 1992b). L'IL-1 $\beta$  a été trouvée en quantité augmentée dans le liquide synovial, dans les synoviocytes et le cartilage de différentes espèces atteintes d'ostéoarthrose, qu'ils soient humains (Smith *et al.* 1997; Towle *et al.* 1997; Melchiorri *et al.* 1998; Moos *et al.* 1999; Hardy *et al.* 2002) ou équins (Morris *et al.* 1990; Bertone *et al.* 2001). Sa présence a été démontrée au niveau de membranes



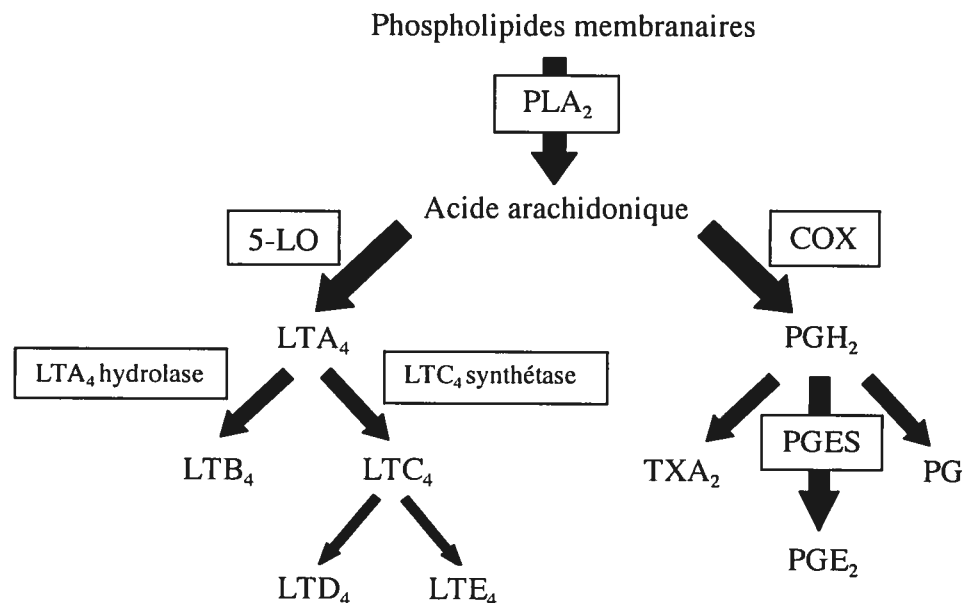
synoviales provenant de patients souffrant d'ostéoartrrose à plusieurs niveaux différents (Smith *et al.* 1997). En plus de la membrane synoviale, les chondrocytes sont également capables de produire de l'IL-1 $\beta$  en quantité augmentée (Moos *et al.* 1999). En effet, il a été démontré que le cartilage souffrant de cette maladie possède la capacité de produire suffisamment d'IL-1 $\beta$  pour promouvoir la dégradation cartilagineuse tout en inhibant les processus de guérison, conduisant alors le cartilage malade vers un processus autodestructeur (Attur *et al.* 1998).

Comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  est capable d'induire la production de MMP (Richardson and Dodge 2000; Sadowski and Steinmeyer 2001; Liacini *et al.* 2002; Tung *et al.* 2002b; Inoue *et al.* 2004) et d'influencer de façon négative le métabolisme des chondrocytes (Lefebvre *et al.* 1990; Schuerwegh *et al.* 2003). Elle stimule la production de collagène de type I et III au détriment du collagène de type II et IX (Pelletier *et al.* 2001), menant à des défauts de réparation de la matrice cartilagineuse. En plus d'affecter la synthèse du collagène, l'IL-1 $\beta$  réduit la production de protéoglycanes, contribuant encore une fois à la mauvaise qualité du cartilage. Finalement, cette cytokine est une inductrice puissante de la cascade de l'acide arachidonique, menant à la production de la PGE<sub>2</sub>, principal écosanoïde impliqué dans le processus inflammatoire intra-articulaire rencontré lors d'ostéoartrrose (May *et al.* 1992b; Platt 1996a; Stichtenoth *et al.* 2001; Takafuji *et al.* 2002; Tung *et al.* 2002c).

### **I.3.3. Cascade de l'acide arachidonique**

La cascade de l'acide arachidonique est la voie par laquelle sont formés les différents écosanoïdes, molécules indispensables à l'homéostasie des différents tissus et organes (se reporter à la figure 3). Parmi les écosanoïdes ainsi produits se trouve la PGE<sub>2</sub>, un médiateur très important de l'inflammation que l'on retrouve dans les articulations lors d'ostéoartrrose. L'acide arachidonique, premier élément de cette cascade, est un acide gras polyinsaturé que l'on retrouve en abondance dans presque tous les tissus et qui provient des phospholipides membranaires (Robinson 1998). Plus précisément, c'est un acide gras dérivé de sources diététiques ou synthétisé dans le corps à partir d'un acide aminé essentiel, l'acide linoléique. Il est ensuite emmagasiné dans la couche lipidique des membranes cellulaires et estérifié aux phospholipides. De cette façon, l'étape limitante dans la biosynthèse des écosanoïdes est la relâche de

l'acide arachidonique de ses sites d'emmagasinement et ce, par des phospholipases spécifiques (Serhan 2001).



**Figure 3:** Enzymes, substrats et produits clés dans la cascade de l'acide arachidonique-selon (Robinson 1998) et (Haeggstrom and Wetterholm 2002).

### I.3.3.1. Phospholipase

La phospholipase est l'enzyme nécessaire pour la transformation des phospholipides membranaires en acide arachidonique (Serhan 2001). C'est la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) qui est responsable du clivage de la liaison ester des phospholipides et dans plusieurs cellules, elle est une enzyme membranaire dépendante du calcium, s'activant lorsque qu'il y a augmentation du calcium intracellulaire (Serhan 2001) (se reporter à la figure 3).

Deux classes majeures de PLA<sub>2</sub> impliquées dans la synthèse de médiateurs lipidiques ont été clonées : la PLA<sub>2</sub> cytosolique (cPLA<sub>2</sub>) et la PLA<sub>2</sub> sécrétoire de type II (Type II sPLA<sub>2</sub>). Bien que l'on en retrouve de façon constitutive chez les chondrocytes normaux et arthritiques (Pruzanski *et al.* 1990; Pruzanski *et al.* 1995), c'est le type II sPLA<sub>2</sub> qui semble être la forme inductible de l'enzyme, puisqu'elle est induite de façon importante lors de la stimulation des chondrocytes avec l'IL-1 $\beta$  (Lyons-Giordano *et al.* 1993), contrairement à la forme cytosolique qui n'est que faiblement induite (Jacques *et*

*al.* 1997). De plus, il a été démontré, chez des fibroblastes, que la cPLA<sub>2</sub> est couplée à la cyclo-oxygénase-1 (COX-1) dans la production constitutive de prostaglandines, tandis que le type II sPLA<sub>2</sub> est couplée à la COX-2 dans la production de prostaglandines induite par des cytokines pro-inflammatoires (Kuwata *et al.* 1998). Cependant, des études récentes semblent démontrer un rôle important de la cPLA<sub>2</sub> dans la génération de prostaglandines suite à une induction pro-inflammatoire et ce, par la production de protéines nécessaires à l'induction du type II sPLA<sub>2</sub> (Mehindate *et al.* 1995; Kuwata *et al.* 1998; Kuwata *et al.* 2005). De plus, la cPLA<sub>2</sub> semble être une enzyme très importante dans la cascade de biosynthèse des leucotriènes (Haeggstrom and Wetterholm 2002). Pour sa part, le type II sPLA<sub>2</sub> semble être une enzyme capable de stimuler l'expression de la COX-2 et donc, en plus de fournir le substrat pour la cascade de l'acide arachidonique, elle serait un amplificateur de cette même cascade, à tout le moins chez des synoviocytes provenant de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Bidgood *et al.* 2000).

Suite à la transformation des phospholipides membranaires par les phospholipases, l'acide arachidonique peut être transformé par deux voies différentes, comportant chacune leurs propres enzymes: la lipoxygénase (LO) et la cyclo-oxygénase (COX) (se reporter à la figure 3).

### **I.3.3.2. Lipoxygénase**

Il existe trois types majeurs de LO qui ont été découverts dans plusieurs tissus chez l'homme : la 5-LO, la 12-LO et la 15-LO (Serhan 2001). C'est la 5-LO qui est responsable de la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes (LT) (se reporter à la figure 3) (Laufer 2003). Il a été démontré que l'ARNm de la 5-LO est exprimé par les synoviocytes souffrant d'ostéoarthrose et par ceux souffrant d'arthrite rhumatoïde (Bonnet *et al.* 1995) ainsi que par les chondrocytes humains ostéoarthritiques (Martel-Pelletier *et al.* 2004).

Le premier produit de la cascade et celui synthétisé par la 5-LO est le LTA<sub>4</sub> (se reporter à la figure 3). Par la suite, le LTA<sub>4</sub> peut être transformé en deux produits différents : le LTB<sub>4</sub> et le LTC<sub>4</sub>. C'est l'enzyme LTA<sub>4</sub> hydrolase qui est responsable de la synthèse du LTB<sub>4</sub>. Cette enzyme est largement distribuée et a été détectée dans presque toutes les cellules de mammifères examinées, y compris les chondrocytes articulaires

humains (Amat *et al.* 1998). Pour ce qui est du LTC<sub>4</sub>, il est synthétisé à partir du LTA<sub>4</sub> par l'enzyme LTC<sub>4</sub> synthétase (Haeggstrom and Wetterholm 2002), qui est également active au niveau des chondrocytes humains en culture (Amat *et al.* 1998). Finalement, le LTC<sub>4</sub> peut être à son tour transformé en ses métabolites, le LTD<sub>4</sub> et le LTE<sub>4</sub> (Robinson 1998). Les leucotriènes sont des acteurs importants dans la stimulation de la production de différentes cytokines, comme l'IL-1, -6 et -8 par les tissus synoviaux (Laufer 2003) et leur importance dans les maladies articulaires est de plus en plus reconnue.

Le LTB<sub>4</sub> est le leucotriène le plus impliqué dans les pathologies articulaires inflammatoires. En effet, plusieurs études ont démontré la présence du LTB<sub>4</sub> dans le liquide synovial de patients atteints d'arthropathies, autant chez les humains (Sahap Atik 1990; Costello *et al.* 1992) que chez les chevaux (Bertone *et al.* 2001). Il a été démontré que les chondrocytes (Martel-Pelletier *et al.* 2004) et la membrane synoviale (He *et al.* 2002) de patients souffrant d'ostéoarthrose peuvent synthétiser du LTB<sub>4</sub>. De plus, c'est un leucotriène capable de stimuler la synthèse et la relâche d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  *in vitro* par des explants de membrane synoviale ostéoarthritique (He *et al.* 2002), ce qui laisse croire que ces deux cytokines sont sous un certain contrôle de la part du LTB<sub>4</sub> (Laufer 2003). Finalement celui-ci est capable d'induire la synthèse de la MMP-1 par les chondrocytes ostéoarthritiques (Martel-Pelletier *et al.* 2004).

### I.3.3.3. Cyclo-oxygénase

La deuxième voie pouvant être empruntée par l'acide arachidonique est celle conduisant à la synthèse des prostaglandines (PG) et des thromboxanes, la voie des cyclo-oxygénases (se reporter à la figure 3). Les COX sont des enzymes ayant pour fonction la conversion de l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub>, qui sera subséquentement convertie en différents écosanoïdes selon l'action de d'autres enzymes en aval de la cascade (ces enzymes seront discutées plus loin dans le mémoire).

Il y a plusieurs années, deux formes de COX ont été identifiées et clonées, la COX-1 et la COX-2 (Furst and Hillson 2001), la COX-3 étant en fait une variante de la COX-1 (Murakami and Kudo 2004). Il existe environ 60% d'homologie entre les deux enzymes, bien qu'elles proviennent de gènes différents (Simon and Strand 2001; Murakami and Kudo 2004). Bien que leur capacité à transformer l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub> soit similaire, leur différence réside dans leurs mécanismes de régulation et

d'expression (Furst and Hillson 2001). La COX-1 est considérée comme la forme constitutive de l'enzyme, tandis que la COX-2 est considérée comme sa forme inductible (Simon and Strand 2001).

Les tissus exprimant le plus de COX-1 de façon constitutive sont les cellules endothéliales, les plaquettes, les reins, l'estomac et les muscles lisses, où son expression semble primordiale à la conservation de l'homéostasie (Furst and Hillson 2001). Plusieurs études faites *in vitro* sur des tissus articulaires ont démontré une expression constitutive de l'ARNm et de la protéine COX-1, de même qu'une non réponse aux stimulations pro-inflammatoires (Kuwata *et al.* 1998). La fonction de la COX-1 au sein de cet organe demeure incertaine, mais son rôle dans la pathogénie de l'ostéoarthrose est de plus en plus reconnu. En effet, une étude récente démontre qu'il y a induction de la COX-1 suite à une stimulation de fibroblastes synoviaux ostéoarthritiques par des cristaux de phosphate basique de calcium (BCP). Ces cristaux étant présents dans le liquide synovial de patients souffrant d'ostéoarthrose, la COX-1 pourrait alors être responsable d'une partie de l'augmentation des prostaglandines rencontrée lors de cette pathologie (Molloy and McCarthy 2005). Une autre étude récente, celle-ci faite sur des tissus synoviaux provenant d'humains ostéoarthritiques, suggère que jusqu'à 30% des PGE<sub>2</sub> pourrait être généré par la COX-1 (Knorth *et al.* 2004).

La COX-2, qui est la forme inductible des COX, conduit également à la formation de la PGH<sub>2</sub>. Cette enzyme est, la plupart du temps, non détectable dans la majorité des tissus, son expression nécessitant le plus souvent une stimulation pro-inflammatoire (Simon and Strand 2001). Plusieurs études ont démontré une augmentation dans l'expression de son ARNm et de sa protéine au niveau de chondrocytes normaux suivant une stimulation pro-inflammatoire et ce, autant chez les humains (Geng *et al.* 1995; Blanco *et al.* 1999), chez les chevaux (Tung *et al.* 2002b; Tung *et al.* 2002c) que chez les autres espèces (Berenbaum *et al.* 1996; Morisset *et al.* 1998; Nedelec *et al.* 2001). Cependant, la COX-2 n'est pas seulement inductible au niveau des chondrocytes, mais peut l'être dans plusieurs autres tissus articulaires affectés ou non de pathologies, comme la membrane synoviale, les ménisques et le fibrocartilage (Hardy *et al.* 2002).

Plusieurs médiateurs de l'inflammation ont la capacité de stimuler l'expression de la COX-2 au niveau des tissus articulaires, qu'ils soient sains ou atteints d'une

pathologie. Bien sûr, comme mentionné précédemment, certaines cytokines, en particulier l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , sont de puissants agents stimulants de l'expression de la COX-2 (Lyons-Giordano *et al.* 1993; Morisset *et al.* 1998; Tung *et al.* 2002b; Tung *et al.* 2002c). De plus, l'expression de cette enzyme semble augmentée par le type II sPLA<sub>2</sub> lorsque cette dernière est combinée à une cytokine pro-inflammatoire (Bidgood *et al.* 2000) et l'IL-17 semble aussi avoir cette propriété inductrice (Shalom-Barak *et al.* 1998).

Cependant, dans certains organes, la COX-2 est également constitutive. Elle est nécessaire à l'homéostasie du cerveau, du système reproducteur, des os, des reins, du système cardiovasculaire et de l'estomac (Simon and Strand 2001), dont seront cités quelques exemples. Au niveau du système reproducteur femelle ont été rapportés des problèmes à plusieurs niveaux, que ce soit au niveau des processus d'ovulation, de fertilisation, d'implantation ou de décidualisation chez les souris déficientes en COX-2 (Lim *et al.* 1997; Davis *et al.* 1999; Norman and Wu 2004). Concernant l'estomac, plusieurs études démontrent que cette enzyme est essentielle pour la défense de la muqueuse gastrique (Peskar 2001; Peskar *et al.* 2001) comme pour la guérison des ulcères (Shigeta *et al.* 1998; Perini *et al.* 2003). La COX-2 semble également indispensable au bon fonctionnement des reins, étant aussi nécessaire que la COX-1 dans la production de la PGI<sub>2</sub> au niveau de cet organe, permettant ainsi la conservation d'une excrétion normale du sodium et un taux de filtration glomérulaire adéquat (Brater 2002; Murakami *et al.* 2002). Quant au système cardiovasculaire, la COX-2 est essentielle pour l'équilibre entre la synthèse de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) par les plaquettes et la synthèse de PGI<sub>2</sub> par l'endothélium vasculaire, dans le but de maintenir un tonus vasculaire normal afin d'éviter les thromboses (Murakami *et al.* 2002; Giannitsis 2005). La COX-2 est donc essentielle à l'homéostasie de plusieurs tissus, son inhibition pouvant induire de graves effets secondaires (Davies and Jamali 2004).

#### **I.3.3.4. Prostaglandine E synthétase**

En aval de la cascade de l'acide arachidonique se trouvent plusieurs enzymes capables de métaboliser la PGH<sub>2</sub> en différents prostanoides et thromboxanes. Parmi ces enzymes, se trouve la prostaglandine E synthétase (PGES), récemment isolée et clonée, qui transforme directement la PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>, principale prostaglandine pro-

inflammatoire (se reporter à la figure 3). Deux formes majeures ont été identifiées jusqu'à présent : la PGES cytosolique (cPGES) et la PGES microsomale (mPGES) (Murakami *et al.* 2002).

La cPGES représente la forme constitutive que l'on rencontre de façon ubiquitaire chez plusieurs cellules et tissus différents. De plus, il a été démontré que cette forme est fonctionnellement couplée à la COX-1 dans l'homéostasie des tissus (Tanioka *et al.* 2000). D'autres études viennent confirmer ces premières découvertes : l'expression de la cPGES, tout comme celle de la COX-1, demeure inchangée suivant une stimulation pro-inflammatoire de synoviocytes atteint d'arthrite rhumatoïde (Stichtenoth *et al.* 2001) et de chondrocytes atteint d'ostéoarthrose (Kojima *et al.* 2004). De plus, il n'y a aucune différence dans l'expression de la cPGES entre les chondrocytes normaux et ostéoarthritiques (Li *et al.* 2005).

La mPGES, quant à elle, est considérée comme la forme inductible de l'enzyme. Celle-ci conduit à la synthèse retardée de la PGE<sub>2</sub> et donc est responsable de la production de cette prostaglandine de façon soutenue suite à un stimulus pro-inflammatoire. Un couplage de la mPGES et de la COX-2 a récemment été démontré au niveau de macrophages murins (Murakami *et al.* 2000). De plus, chez des synoviocytes atteints d'arthrite rhumatoïde *in vitro*, une stimulation par l'IL-1 $\beta$  peut induire une stimulation simultanée de l'ARNm et de la protéine de la mPGES et de la COX-2, menant à une augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture. En plus de cette expression augmentée, l'activité de ces deux enzymes est aussi stimulée (Stichtenoth *et al.* 2001; Kojima *et al.* 2002). Le même phénomène est observable au niveau d'ostéoblastes étudiés *in vitro*, démontrant l'importance de l'expression combinée de la mPGES et de la COX-2 dans le mécanisme de résorption osseuse induite par les cytokines pro-inflammatoires (Saegusa *et al.* 2003). De plus, la mPGES semble être stimulée de façon autocrine par sa propre production de PGE<sub>2</sub>.

Tout récemment, deux formes de mPGES ont été identifiées : la mPGES-1 (Jakobsson *et al.* 1999; Ouellet *et al.* 2002) et la mPGES-2 (Tanikawa *et al.* 2002). La mPGES-2 semble être la forme constitutive des mPGES, et est couplée légèrement préférentiellement à la COX-2, bien qu'elle le soit également avec la COX-1 et ce, au niveau de plusieurs tissus testés *in vitro* suite à des stimulations par des molécules pro-inflammatoires. Ce même phénomène se rencontre au niveau de synoviocytes atteints

d'arthrite rhumatoïde, où l'on retrouve une expression constante de la mPGES-2, peu importe le degré de sévérité de la condition et même chez les patients où la maladie est inactive (Murakami *et al.* 2003). De même, on retrouve une expression inchangée de cette enzyme chez des chondrocytes ostéoarthritiques *in vitro* (Kojima *et al.* 2004).

Pour sa part, la mPGES-1 est considérée comme la forme inductible de l'enzyme. Découverte avant la mPGES-2, la mPGES-1 est induite par des stimulations pro-inflammatoires (Jakobsson *et al.* 1999). De plus, elle est couplée avec la COX-2 dans la production de PGE<sub>2</sub> par plusieurs tissus et les deux enzymes répondent similairement aux stimulations (Lazarus *et al.* 2002; Murakami *et al.* 2003). Le même comportement de la mPGES-1 est retrouvé chez des synoviocytes rhumatoïdes où l'ampleur de son expression correspond bien au degré de sévérité de la maladie (Murakami *et al.* 2003). Des modèles animaux d'arthrite inflammatoire ont également démontré un couplage fonctionnel entre la mPGES-1 et la COX-2 (Claveau *et al.* 2003). Cette enzyme joue donc un rôle majeur dans les processus pathologiques et son inhibition au niveau génique a pour effet de diminuer la sévérité des lésions cartilagineuses chez des souris mPGES-1 *-/-* (Trebino *et al.* 2003).

Au niveau des chondrocytes, on retrouve le même comportement de la part de la mPGES-1 (Molloy and McCarthy 2005). Que ce soit au niveau de l'ARNm ou de la protéine, on retrouve son expression combinée à celle de la COX-2 après stimulation de chondrocytes ostéoarthritiques (Kojima *et al.* 2004). Les chondrocytes de patients souffrant d'ostéoarthrose, contrairement aux chondrocytes normaux, démontrent une expression de l'ARNm et de la protéine mPGES-1 (Li *et al.* 2005). De plus, les chondrocytes ostéoarthritiques démontrent une induction de cette même expression suite à des stimulations par l'IL-1 $\beta$  (Masuko-Hongo *et al.* 2004), le TNF- $\alpha$  et l'IL-17 (Li *et al.* 2005). La mPGES-1 est donc une enzyme d'importance première dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> rencontrée lors d'ostéoarthrose (Kojima *et al.* 2005).

#### **I.3.4. Prostaglandines**

Les prostaglandines sont des écosanoïdes ayant de courtes demi-vies, et sont métabolisés rapidement en formes inactives par les tissus environnants (Serhan 2001). Dans les paragraphes précédents, il a été question de la cascade enzymatique menant à la production de la prostaglandine la plus importante dans l'inflammation, la PGE<sub>2</sub>.



Cependant, d'autres écosanoïdes très importants dans l'homéostasie des tissus sont également produits et ils ont chacun une synthétase responsable de leur production (Kojima *et al.* 2005). Nous retrouvons donc la PGD<sub>2</sub>, la PGF<sub>2A</sub>, la PGI<sub>2</sub> et la TXA<sub>2</sub>.

#### **I.3.4.1. Prostaglandine E<sub>2</sub> et ostéoarthrose**

De plus en plus d'études incriminent la PGE<sub>2</sub> comme étant la prostaglandine majeure rencontrée dans les processus inflammatoires comme l'ostéoarthrose et l'arthrite rhumatoïde. En effet, la PGE<sub>2</sub> se retrouve en concentration augmentée dans les articulations de patients souffrant d'arthropathies dégénératives (Hawkins *et al.* 1993; Gibson *et al.* 1996; Kirker-Head *et al.* 2000). Chez les chevaux, cette prostaglandine a été trouvée comme bon indicateur de la présence et de la sévérité des maladies articulaires (Bertone *et al.* 2001). Récemment, il a été démontré que la membrane synoviale et le cartilage d'articulations atteintes d'ostéoarthrose sont capables de relâcher de façon spontanée des PGE<sub>2</sub> *in vitro* et ce, sans stimulation préalable (Von Rechenberg *et al.* 2000). De plus, elle contribue à la dégénérescence des articulations en affectant non seulement le cartilage, mais plusieurs autres tissus articulaires. Elle agit sur la physiologie du cartilage en étant capable d'induire les mécanismes conduisant à l'apoptose des chondrocytes et ce, de façon directe ou indirecte (Miwa *et al.* 2000; Notoya *et al.* 2000; Pelletier *et al.* 2001a). La PGE<sub>2</sub> peut également induire la production de plusieurs MMP (Mehindate *et al.* 1995), diminuer la synthèse et promouvoir la dégradation des protéoglycanes (Morris and Treadwell 1994; Hardy *et al.* 2002). Elle peut également agir au niveau de l'os sous-chondral en stimulant la résorption osseuse et la formation d'ostéophytes par les ostéoclastes (Hardy *et al.* 2002; Laufer 2003; Saegusa *et al.* 2003). Finalement, la PGE<sub>2</sub> peut stimuler sa propre production induite par l'IL-1 $\beta$ , chez des fibroblastes synoviaux atteints d'arthrite rhumatoïde (Kojima *et al.* 2003). La PGE<sub>2</sub> est donc intimement reliée à la pathogénie de l'ostéoarthrose.

Cependant, des effets bénéfiques de la PGE<sub>2</sub> sur les tissus articulaires ont été récemment découverts. Une étude faite sur des chondrocytes équins *in vitro* a démontré que l'ajout de PGE<sub>2</sub> exogène à ces cultures avait pour effet de diminuer l'expression des MMP-1, -3, -13, et TIMP-1 (Tung *et al.* 2002a) et suit les résultats d'une autre étude faite sur des chondrocytes humains (DiBattista *et al.* 1994). Il faut toutefois prendre en

considération un élément important : les concentrations de PGE<sub>2</sub> utilisées dans ces études sont bien supérieures à celles retrouvées dans le liquide synovial de patients souffrant de pathologies articulaires, ce qui met en doute l'importance clinique de ces effets bénéfiques.

Il a également été démontré que la PGE<sub>2</sub> peut augmenter l'expression du facteur de croissance IGF-1 via une boucle de rétrocontrôle autocrine (DiBattista *et al.* 1996). L'IGF-1 semble être un des facteurs de croissance les plus importants impliqués dans les mécanismes anaboliques du cartilage (se reporter au tableau II). En fait, il a été démontré capable de stimuler la production des composants de la matrice extracellulaire par les chondrocytes, comme le collagène de type II et les protéoglycanes (Martel-Pelletier *et al.* 1998). Donc, selon cette étude, la PGE<sub>2</sub> semble bénéfique pour le métabolisme cartilagineux. Cependant, il a été démontré que les protéines 3 et 4 liant le IGF-1 (IGFBP-3 et IGFBP-4) inhibent l'action du IGF-1 sur les cellules et ce, sous plusieurs conditions expérimentales (Martel-Pelletier *et al.* 1998). Il a également été démontré que la PGE<sub>2</sub> est capable d'augmenter l'expression de ces deux protéines liant le IGF-1 par les chondrocytes articulaires en culture (Di Battista *et al.* 1996; Di Battista *et al.* 1997). L'interprétation de ces résultats est donc ambiguë, la PGE<sub>2</sub> n'augmentant pas seulement l'expression du IGF-1, mais également celle de ses deux inhibiteurs : IGFBP-3 et IGFBP-4.

## I.4. Culture de chondrocytes

### I.4.1. Introduction

Dans des conditions appropriées, la plupart des cellules animales seront capables de vivre, de se multiplier et d'exprimer plusieurs propriétés dans un plateau de culture tissulaire. Les cellules peuvent ensuite être observées sous microscope ou analysées biochimiquement. Ces analyses sont appelées *in vitro*, étant faites sur des cellules dans des plateaux de culture et non au sein d'un animal (Alberts *et al.* 1994).

Les cultures cellulaires ont débuté en 1907 et impliquaient alors la culture de petits fragments de tissu, nommés explants. Maintenant, les cultures sont le plus souvent faites à partir de suspension de cellules isolées de différents tissus. La plupart des cellules ne sont pas adaptées pour vivre en suspension et donc requièrent une surface solide sur laquelle elles peuvent croître et se diviser, ce que l'on obtient la plupart du temps avec des plateaux de culture (Alberts *et al.* 1994).

Les cultures cellulaires préparées directement à partir des tissus d'un organisme sont appelées cultures primaires. Dans la plupart des cas, ces cellules peuvent être retirées de leur plateau de culture primaire et être utilisées pour former plusieurs cultures secondaires; la procédure nécessaire pour former ces cultures se nomme un « passage » (Freshney 1990; Alberts *et al.* 1994). Certaines cellules peuvent subir plusieurs passages pendant plusieurs semaines ou mois tout en gardant leur phénotype et leurs caractéristiques (Alberts *et al.* 1994). Cependant, d'autres types cellulaires qui ont tendance à se différencier, comme les chondrocytes, ne peuvent subir aucun passage, ceci entraînant la perte des caractéristiques propres du type cellulaire primaire (Nixon *et al.* 1992; Alberts *et al.* 1994).

La culture de chondrocytes est un des outils les plus puissants dont nous disposons pour explorer les caractéristiques moléculaires et intra-cellulaires de l'activation et de la différenciation des chondrocytes (Thirion and Berenbaum 2004). Les chondrocytes isolés maintenus *in vitro* sous différentes conditions de culture ont fourni de l'information importante sur le métabolisme du cartilage articulaire (Platt 1996b). Plusieurs techniques ont été développées pour l'étude du métabolisme des chondrocytes cultivés *in vitro* (Adolphe and Benoit 1994; Huch *et al.* 2002; Thirion and Berenbaum 2004).

#### **I.4.2. Culture en monocouche**

La culture en monocouche est la forme de culture cellulaire la plus rapportée dans la littérature au sujet des chondrocytes (Freshney 1990; Platt 1996b), et elle implique la libération de ceux-ci de leur matrice extracellulaire. Pour se faire, plusieurs techniques utilisant la digestion enzymatique matricielle séquentielle ont été décrites (Adolphe and Benoit 1994; Platt 1996b). Par la suite, les chondrocytes fraîchement isolés et implantés dans les plateaux de culture adhèrent à la surface de plastique et y sont ancrés solidement, ce qui permet des changements de milieu de culture sans pertes de cellules (Freshney 1990; Platt 1996b). Les cultures en monocouche sont définies comme des cultures dans lesquelles la densité cellulaire varie entre 5 et  $16 \times 10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$  (Platt 1996b). Les cellules cultivées en concentrations plus élevées sont appelées cultures cellulaires de haute densité et possèdent des caractéristiques différentes (Watt 1988; Platt 1996b). Une autre des caractéristiques des cultures en monocouche est leur capacité proliférative élevée (Platt 1996b; Huch *et al.* 2002). Cette prolifération de chondrocytes est un processus non physiologique pouvant mener à leur dédifférenciation, surtout lorsque ces derniers subissent plusieurs passages (Platt 1996b).

Malgré ces limitations, les chondrocytes cultivés en monocouche demeurent un modèle de culture très utile pour l'étude de processus variés, comme par exemple le nombre de récepteurs membranaires et leurs affinités, les interactions cellule-cellule, la relâche de facteurs cellulaires, la synthèse de matrice et l'influence de facteurs régulateurs (Platt 1996b).

#### **I.4.3. Phénomène de dédifférenciation des chondrocytes en culture**

Le problème majeur rencontré lors de culture de chondrocytes est leur dédifférenciation en fibroblastes. Presque 90% du collagène qui est synthétisé par les chondrocytes articulaires est de type II, le 10% restant étant occupé par les autres collagènes (Platt 1996b). La dédifférenciation des chondrocytes, causée par les conditions de culture, résulte en la perte de leur morphologie sphérique au dépend d'une forme fibroblastique allongée (Glowacki *et al.* 1983; Platt 1996b). Cette transition est universelle et quelques facteurs ont été associés à une augmentation de la tendance vers

la dédifférenciation : mise en culture d'une basse densité cellulaire (Watt 1988), cultures en monocouche, resuspension des chondrocytes (Nixon *et al.* 1992; Hering *et al.* 1994), traitements avec des cytokines pro-inflammatoires, utilisation de sérum (Stewart *et al.* 2000) et extraction de chondrocytes d'humains adultes (Thirion and Berenbaum 2004).

La conversion des chondrocytes en fibroblastes peut être déterminée, basée sur la diminution de la production du collagène de type II au bénéfice du collagène de type I et III (Mayne *et al.* 1976; Ronziere *et al.* 1997; Binette *et al.* 1998; Thirion and Berenbaum 2004). De plus, lors de la dédifférenciation des chondrocytes, ces derniers produisent de moins en moins de protéoglycanes de haut poids moléculaire comme l'aggrécane, au profit de protéoglycanes de petit poids moléculaire (Binette *et al.* 1998; Thirion and Berenbaum 2004).

Des efforts sont déployés pour éviter ce phénomène de dédifférenciation, que ce soit l'essai d'autres systèmes de culture comme les cultures à haute densité (Watt 1988; Hering *et al.* 1994; Ronziere *et al.* 1997), en réseau tridimensionnel (Freyria *et al.* 2004), en suspension (Hauselmann *et al.* 1994; Binette *et al.* 1998), en agrégats ou en culots de centrifugation, où les chondrocytes semblent se comporter davantage comme des cellules *in vivo* (Stewart *et al.* 2000). L'ajout de certaines substances comme l'acide ascorbique (Hering *et al.* 1994; Ronziere *et al.* 1997) et la BMP-2 semblent aider à la conservation du phénotype et ce, même lors de cultures en monocouche (Sailor *et al.* 1996; Stewart *et al.* 2000).

#### **I.4.4. Avantages et inconvénients des cultures cellulaires**

##### **I.4.4.1. Avantages**

###### **I.4.4.1.1 Contrôle de l'environnement**

L'avantage majeur des cultures cellulaires est le contrôle précis de l'environnement physicochimique entourant les cellules (Freshney 1990), donc la possibilité de diminuer le niveau de complexité de l'environnement *in vivo* (Platt 1996b). Les conditions physiologiques peuvent également être gardées de façon relativement constantes (Freshney 1990; Shepherd 2000).

#### **I.4.4.1.2. Économies**

Les cultures cellulaires peuvent être exposées directement à un agent à des concentrations moindres et bien établies, et ayant un accès direct aux cellules concernées. Les études nécessitant l'analyse de plusieurs variables et la production de répliques sont donc beaucoup moins dispendieuses que lorsque faites *in vivo* (Freshney 1990).

#### **I.4.4.2. Désavantages**

##### **I.4.4.2.1. Expertise**

La croissance des cellules animales étant beaucoup moins rapide que celle de la majorité des contaminants, comme les bactéries et les moisissures, les techniques de cultures cellulaires doivent être réalisées sous des conditions d'asepsie stricte. De plus, les cellules en provenance d'animaux pluricellulaires sont incapables de survivre à l'état isolé, et donc incapables de survivre sans approvisionnement en environnement simulant le plasma sanguin ou le liquide interstitiel. Ceci implique donc un niveau de compréhension adéquat du système pour pouvoir en apprécier les besoins (Freshney 1990).

##### **I.4.4.2.2. Quantité**

La limitation majeure des cultures cellulaires concerne les efforts demandés et tout le matériel requis pour une production relativement faible de cellules (Freshney 1990).

#### **I.4.5. Différences majeures entre les études *in vitro* et *in vivo***

Les différences majeures proviennent de la dissociation des cellules de leur milieu géométrique en trois dimensions et leur propagation sur un substrat en deux dimensions (Freshney 1990). Certaines interactions entre les cellules elles-mêmes et entre les cellules et leur matrice, caractéristiques de l'histologie du tissu, sont perdues (Freshney 1990; Platt 1996b).

L'environnement de culture manque aussi de plusieurs signaux, tant chimiques que physiques, impliqués dans la régulation de l'homéostasie *in vivo* (Platt 1996b).

Sans ce contrôle, le métabolisme peut être plus constant *in vitro* que *in vivo*, ce qui n'est peut-être pas très représentatif du tissu duquel proviennent les cellules (Freshney 1990).

Plusieurs autres différences sont retrouvées entre les études faites *in vitro* et celles *in vivo* (Freshney 1990). Cependant, il ne faut pas oublier que plusieurs fonctions spécialisées des cellules sont également exprimées en culture. Donc, aussi longtemps que les limites du modèle sont reconnues, la culture cellulaire devient un outil très intéressant, aidant à la compréhension des mécanismes physiologiques et pathologiques des différents tissus. Elle permet ainsi de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la dégénérescence de la matrice cartilagineuse lors d'ostéoarthrose (Freshney 1990; Platt 1996b).

#### **I.4.6. Modèles *in vitro* d'ostéoarthrose**

Plusieurs modèles de cultures cellulaires ont été élaborés pour l'étude de l'ostéoarthrose *in vitro*. Certaines études sont réalisées à partir de chondrocytes ostéoarthritiques qui sont tout simplement cultivés sans aucune stimulation et ce, dans le but d'analyser leur métabolisme spontané et de le comparer avec celui de chondrocytes normaux (Von Rechenberg *et al.* 2000). Il existe cependant d'autres modèles *in vitro* qui utilisent des stimulations variées, essayant autant les uns que les autres de représenter le plus fidèlement possible les mécanismes rencontrés lors de pathologie articulaire.

Un des modèles d'ostéoarthrose *in vitro* le plus fréquemment rencontré est celui utilisant l'IL-1 $\beta$  comme stimulation pro-inflammatoire. L'IL-1 $\beta$  est utilisée pour son implication importante au sein des articulations lors d'ostéoarthrose, comme discuté précédemment. Une autre molécule souvent utilisée est le TNF- $\alpha$ , pour les raisons également mentionnées dans les pages précédentes.

Toujours en ce qui concerne les molécules pro-inflammatoires, les lipopolysaccharides (LPS) étaient fréquemment utilisés auparavant dans les modèles d'ostéoarthrose *in vitro*. Aujourd'hui, ces molécules sont plutôt réservées aux études sur les phénomènes septiques, les LPS provenant de la paroi des bactéries à gram négatif (MacDonald and Benton 1996).

Une technologie récemment développée est l'application de forces de compression intermittentes à des cultures de cellules articulaires normales, dans le but

d'induire les changements observés lors d'ostéoarthrose. Cette nouvelle technique de stimulation cellulaire semble prometteuse, reflétant ainsi probablement mieux l'initiation de la pathologie suite aux stress mécaniques exercés sur les articulations, permettant alors la réalisation d'études *in vitro* se rapprochant plus des phénomènes retrouvés *in vivo* (Sauerland et al. 2003).



### I.5. Hypothèse et objectif

La PGE<sub>2</sub> semble être un acteur majeur dans la perpétuation de l'inflammation et par le fait même, dans la dégénérescence de la matrice cartilagineuse. De plus, nous croyons maintenant que c'est fort probablement la mPGES-1, couplée à la COX-2, qui est responsable de la production de PGE<sub>2</sub> en quantité importante dans les phénomènes pathologiques comme l'ostéoarthrose et ce, peu importe l'espèce étudiée. Notre hypothèse était donc qu'une stimulation pro-inflammatoire serait responsable d'une induction concomitante de l'expression des enzymes COX-2 et mPGES-1, conduisant à la synthèse de PGE<sub>2</sub>.

Quelques études ont démontré l'induction de l'expression de la mPGES-1 par des chondrocytes ostéoarthritiques *in vitro* suite à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, aucune ne concerne l'expression de la mPGES-1 chez des chondrocytes normaux de chevaux. L'objectif de notre étude était donc la caractérisation de l'effet de la rhIL-1 $\beta$  sur l'expression de la mPGES-1 et de la COX-2, et sur la régulation de la synthèse de la PGE<sub>2</sub>, chez des chondrocytes équins normaux en culture monocouche.

## **Chapitre II : Article**

Présentation sous forme d'article.

Article accepté le 1<sup>er</sup> février 2005 par la revue « American Journal of Veterinary Research».

Version finale révisée le 17 mai 2005.

**Evaluation of co-expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 in interleukin-1-stimulated equine articular chondrocytes**

Judith Farley, DVM; Jean Sirois, DVM, PhD; Patrick-Hubert Mac Farlane, BSc;  
Aimé Kombé, MSc; Sheila Laverty, MVB

From the Département des Sciences Cliniques (Farley, Mac Farlane, Kombé, Laverty) and  
the Département de Biomédecine Vétérinaire (Sirois), Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Presented at the American College of Veterinary Surgeons 13<sup>th</sup> annual veterinary  
symposium in Washington DC in October 2003.

Address correspondence to Dr. Laverty  
Département des Sciences Cliniques,  
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal,  
C.P. 5000  
St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6  
Tel: 450-778-8100  
Fax: 450-778-8158  
Email: [sheila.laverty@umontreal.ca](mailto:sheila.laverty@umontreal.ca)

## II.1. Summary

**Objective**—To characterize expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) and regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production by equine articular chondrocytes.

**Sample population**—Articular cartilage from the metacarpophalangeal joints of 7 adult horses.

**Procedure**—Equine chondrocyte monolayer cultures were stimulated with different concentrations (2.5, 5, 10 and 20 ng/mL) of recombinant human interleukin-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ) for 24 hours and then with rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for 3, 6, 9, 12 and 24 hours. Concentration of PGE<sub>2</sub> in the media was measured via radioimmunoassay. Total RNA was extracted from harvested chondrocytes and regulation of COX-2 and mPGES-1 mRNA was studied via reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay and Southern blot analysis with equine-specific probes. Western blot analyses were performed on cellular extracts to characterize expression of COX-2 and mPGES-1 protein.

**Results**—Stimulation with 5, 10 and 20 ng of rhIL-1 $\beta$ /mL caused a significant increase in PGE<sub>2</sub> concentrations in the culture media, whereas incubation of cells with rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for 6 to 24 hours increased PGE<sub>2</sub> production significantly. The increase in prostaglandin production was associated with an induction of COX-2 and mPGES-1 transcripts. There also was an rhIL-1 $\beta$ -dependent induction in COX-2 and mPGES-1 protein expression.

**Conclusions and Clinical Relevance**—Collectively, results indicated that the rhIL-1 $\beta$ -dependent increase in PGE<sub>2</sub> production in equine chondrocytes in monolayer culture was associated with coordinated up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression. The pathophysiologic consequences of upregulated COX-2 and mPGES-1 expression, and of PGE<sub>2</sub> synthesis, in rhIL-1 $\beta$ -stimulated equine chondrocytes remain to be elucidated.

## II.2. Introduction

Studies on the pathophysiology of osteoarthritis provide evidence that inflammatory mediators have an important role in the initiation and progression of the disease. Mediators exert their effects in the cartilage matrix but also on other joint tissues.<sup>1-6</sup> Pro-inflammatory cytokines induce the development and enhance the progression of lesions of osteoarthritis.<sup>1</sup> The pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) is produced by joint cells<sup>2,3,7,8</sup> during osteoarthritis and is present in large amounts in synovial fluid of horses with osteoarthritis.<sup>9,10</sup> Affected human cartilage releases sufficient amounts of IL-1 $\beta$  to promote cartilage degradation, while inhibiting its repair, leading the affected cartilage to an auto-destructive pathway.<sup>11</sup> Results of many studies indicate that IL-1 not only induces the synthesis of degradative proteinases by synovial cells and chondrocytes<sup>12-14</sup> but also prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a major<sup>15-21</sup> mediator of inflammation.

Increased concentrations of PGE<sub>2</sub> during naturally occurring disease or after cytokine stimulation have a central role in the development and progression of osteoarthritis.<sup>22</sup> It has been recently reported that PGE<sub>2</sub> induces apoptosis of bovine articular chondrocytes<sup>23</sup> and that its production is required for caspase-dependent chondrocyte death induced by nitric oxide in affected canine and human chondrocytes.<sup>24,25</sup> Additionally, PGE<sub>2</sub> stimulates production of matrix metalloproteinases (MMPs)<sup>26</sup> and could be responsible, in part, for the degradation of proteoglycans in affected joints.<sup>21</sup> Furthermore PGE<sub>2</sub> can cause bone resorption and also may be involved in osteophyte formation encountered in osteoarthritis patients.<sup>27,28</sup> Taken together, these studies suggest a role for PGE<sub>2</sub> in the progression of osteoarthritis.

Prostaglandin E<sub>2</sub> is produced by the activity of 2 important enzymes, cyclooxygenase (COX) and prostaglandin E synthase (PGES), in the arachidonic acid pathway. Prostaglandin E synthase converts the product of the COX enzymes, prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), into PGE<sub>2</sub>.<sup>29</sup> Two major isoforms of COX and PGES exist. The constitutive pathway is formed by COX-1 and the cytosolic isoform of PGES, cPGES.<sup>30</sup> The inducible pathway, responsible for increased production of PGE<sub>2</sub> in inflammatory processes, includes COX-2 and the recently identified microsomal isoform of PGES,

mPGES.<sup>31</sup> Different forms of mPGES have also been isolated.<sup>32</sup> mPGES-1<sup>33</sup> and mPGES-2.<sup>34</sup> Microsomal PGES-1, recently characterized and cloned,<sup>33,35</sup> is selectively up-regulated during COX-2-dependent PGE<sub>2</sub> production in the rat adjuvant-induced arthritis model.<sup>36</sup> Microsomal PGES-1 is also up-regulated with COX-2 after IL-1 $\beta$  or tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  stimulation in human chondrocytes affected by osteoarthritis, whether mPGES-2 remains constitutively expressed and unaffected by proinflammatory stimulation.<sup>37</sup> Moreover, mPGES-1 inhibition at gene level can decrease the severity of cartilage lesions seen in mPGES-1-deficient mice after experimentally induced inflammatory arthritis.<sup>38</sup> The results of these studies suggest an important role for mPGES-1 induction in joint disease.

Our hypothesis, based on the knowledge that COX-2 is up-regulated in equine articular chondrocytes by a pro-inflammatory stimulus,<sup>15,39</sup> was that pro-inflammatory stimulation by IL-1 $\beta$  would concurrently increase COX-2 and mPGES-1 mRNA and protein expression. The objective of our study was to characterize the expression of COX-2 and mPGES-1, and the regulation of PGE<sub>2</sub> production by normal equine articular chondrocytes.

## II.3. Methods

### II.3.1. Source of tissues and cell culture

Macroscopically normal articular cartilage was aseptically harvested from the weight-bearing surface of the metacarpophalangeal joints of 7 adult (10 to 15 years old) Standardbreds, obtained at an abattoir. Chondrocytes were isolated via 2 sequential digestions with trypsin<sup>a</sup> and collagenase.<sup>b</sup> Briefly, full thickness cartilage slices were washed 3 times with Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)<sup>c</sup> that contained penicillin (400 000 U/L)/streptomycin (400 µg/L),<sup>d</sup> gentamicin (150 mg/L)<sup>e</sup> and HEPES buffer (0.02 M).<sup>f</sup> Cartilage slices were incubated at 37°C and gently agitated with sterile trypsin solution (0.05% trypsin and 0.01% EDTA<sup>g</sup>) for 25 minutes and subsequently by collagenase solution (0.05% collagenase and 10% fetal bovine serum (FBS)<sup>h</sup>) for 11 to 13 hours. The supernatant was filtered with a 70 µm cell strainer,<sup>i</sup> the cells were washed 3 times and centrifuged (500 X g for 6 minutes, 3 times). Chondrocytes were counted with a hemacytometer<sup>j</sup> and their viability was assessed with a Trypan blue dye solution.<sup>k</sup> Chondrocyte viability was > 97% at the outset of each experiment. The chondrocytes of both normal metacarpophalangeal joints of the same horse were pooled together, however chondrocytes from different horses were never pooled. Chondrocytes were diluted to a final concentration of 0.5x10<sup>6</sup> cells per mL of DMEM that contained penicillin (100 000 U/L)/streptomycin (100 µg/L), gentamicin (150 mg/L), HEPES buffer (0.02 M) and fetal bovine serum (FBS [10%]).

Three sizes of culture dishes were used to accommodate the need of sufficient materials for different analyses. Twenty four-well culture plates<sup>l</sup> were used for studies designed to measure changes in PGE<sub>2</sub> production in the culture media. Six-well plates<sup>m</sup> were required for analyses requiring RNA extracts, whereas large culture dishes<sup>n</sup> (10 cm in diameter) were used in selected experiments to provide sufficient protein extracts for western blots. Cells were seeded as 1, 3 and 5 mL of chondrocyte solution (0.5 X 10<sup>6</sup> cells/mL) to a 24-well plate, 6-well plate and 10 cm culture dish, respectively. All culture plates were incubated in a humid, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator until cell adherence to the wells. The culture media was changed every 48 hours until chondrocytes reached confluence. Twenty-

four hours prior to the recombinant human interleukin-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ )<sup>o</sup> stimulation, cells were cultured in serum-free media.

## **II.3.2. Study design**

### **II.3.2.1. Experiment 1**

In experiment 1, 4 horses were used. Equine chondrocytes cultured in 24-well plates were stimulated with 0 (control), 2.5, 5, 10 and 20 ng/mL of rhIL-1 $\beta$  for 24 hours to study the effect of the cytokine on PGE<sub>2</sub> production. Each treatment was performed in duplicate wells, and the study was replicated twice with 2 horses. A similar dose-response study was performed to characterize the regulation of COX-2 and mPGES-1 mRNA, by use of chondrocytes cultured in 6-well plates for 24 hours in the presence of 0 (control), 2.5, 5, 10 and 20 ng/mL of rhIL-1 $\beta$ . The latter study was repeated twice on 2 other horses.

### **II.3.2.2. Experiment 2**

In experiment 2, a group of 3 horses was used. The time-dependent regulation of PGE<sub>2</sub> production and of COX-2 and mPGES-1 mRNA expression by rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) was characterized in equine chondrocytes cultured for 0, 3, 6, 9, 12 and 24 hours. For the PGE<sub>2</sub> production, cells were cultured in 24-well plates and each time point analysis was performed in duplicate wells, whereas the regulation of COX-2 and mPGES-1 mRNA was studied in cells cultured in 6-well plates. The regulation of COX-2 and mPGES-1 protein by rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) was performed by use of 10 cm-culture dishes, but only on selected time points (0, 12 and 24 hours of culture) because of limited numbers of cells. These analyses were replicated 3 times with 3 other horses.

## **II.3.3. PGE<sub>2</sub> measurement**

At the end of the culture period, the media were frozen at -70° C until further analysis. Samples were collected at each concentration or time point and analyzed separately. Concentrations of PGE<sub>2</sub> were measured directly in culture media by use of a specific radioimmunoassay (RIA), as described.<sup>40</sup> The antiserum<sup>p</sup> had cross-reactivities against PGE<sub>1</sub>, PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , and 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  of 70%, 1.4%, 0.7% and 0.6%, respectively.



The sensitivity of the assay was 62.5 pg/mL, and the intra and inter-assay coefficients of variation were 9.2% and 12.3%, respectively.

#### **II.3.4. Semiquantitative RT-PCR and Southern blot analysis**

At the end of the culture period, cells were harvested in 1 mL of Trizol reagent,<sup>a</sup> homogenized and stored at -70° C until further analysis. Briefly, the Trizol reagent that contained the cell lysate was incubated at 20° C for 5 minutes. Chloroform<sup>f</sup> was added to the solution, which was vigorously agitated and a second incubation was performed for 3 minutes. Following centrifugation, the aqueous phase that contained the RNA was removed. The RNA was precipitated with 100% ethanol<sup>g</sup> and washed with 70% ethanol. After ethanol evaporation, the RNA was resuspended in sterile diethyl pyrocarbonate (DEPC)<sup>h</sup> water and quantified spectrophotometrically.

A commercial RT-PCR system<sup>h</sup> was used for semi-quantitative analysis of COX-2 and mPGES-1 mRNA. Reactions were performed as directed by the manufacturer with sense (5'-GAG CAG GCT CAT ACT GAT AGG AG-3') and anti-sense (5'-GAG TGC TTC TAA CTC CGC AGC C-3') primers specific for equine COX-2, sense (5'-AAC GAC ATG GAG ACC ATC TAC CC -3') and anti-sense (5'-TCT TGA CAG CTC GTC TCT AAA CGG-3') primers specific for equine mPGES-1, and sense (5'-ATC ACC ATC TTC CAG GAG CGA GA -3') and anti-sense (5'-GTC TTC TGG GTG GCA GTG ATG G-3') primers specific for equine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). These reactions resulted in the production of COX-2, mPGES-1 and GAPDH cDNA fragments of 489, 476, 341 bp, respectively. Each reaction was performed with 100 ng of total RNA, and cycling conditions were 1 cycle of 48° C for 45 minutes and 94° C for 2 minutes, followed by a variable number of cycles of 94° C for 30 seconds, 58° C for 1 minute, and 68° C for 2 minutes. The number of cycles used was optimized for each gene to fall within the linear range of PCR amplification and were 16 cycles for COX-2 and GAPDH, and 18 cycles for mPGES-1. After PCR amplification, samples were electrophoresed on 2% tris-acetic acid-EDTA-agarose (TAE-agarose) gels,<sup>i</sup> transferred to nylon membranes, and hybridized with corresponding radiolabeled COX-2, mPGES-1 and GAPDH cDNA fragments with a

hybridization solution,<sup>w</sup> as described.<sup>41</sup> Membranes were exposed to a phosphor screen, and signals were quantified on an imaging system<sup>x</sup> by use of software.<sup>y</sup>

### II.3.5. Western blot analyses

Solubilized cell extracts and western blot analyses were performed as described.<sup>42</sup> Briefly, cells were homogenized and sonicated on ice in TED (20 mM Tris,<sup>z</sup> pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.1 mM diethyldithiocarbamic acid [DETC]<sup>aa</sup>) buffer that contained 1.0% Tween (polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate).<sup>bb</sup> The sonicates were centrifuged at 16,000 X g for 15 minutes at 4° C. The recovered supernatant (whole cell extract) was stored at –70° C until electrophoretic analyses were performed. Protein concentration was determined by the method of Bradford.<sup>43</sup> Samples (100 µg of proteins) were resolved by one-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),<sup>cc</sup> and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF)<sup>dd</sup> membranes.<sup>42</sup> Blocking of membranes was done with 5% nonfat dry milk in 0.1% TTBS (0.1% Tween-20, 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.5) for 1 hour at 20° C, then washed twice for 2 minutes at 20° C with 0.1% TTBS. After blockage, membranes were incubated with a selective anti-COX-2 antibody (MF243<sup>ee</sup> at 1:7,500 dilution) or anti-mPGES-1 antibody<sup>ff</sup> (1:1000 dilution) diluted in 0.05% TTBS (0.05% Tween-20, 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.5) containing 2% nonfat dry milk overnight at 4° C. Membranes were incubated with a horseradish-peroxidase-labeled donkey anti-rabbit secondary antibody<sup>gg</sup> (1:15,000 dilution) for 1 hour at 20° C. Membranes were washed and the bound secondary antibody was detected by use of the enhanced chemiluminescence system and following the manufacturer's protocol.<sup>hh</sup> The signal was visualized on X-ray film.

### II.3.6. Statistical analyses

A 2-way ANOVA, with horse identity and concentration of rhIL-1β included as factors, was used to test for effects of rhIL-1β on PGE<sub>2</sub> production. When the ANOVA indicated a significant ( $P < 0.05$ ) difference, Tukey post-hoc tests were used to compare pairs of means. An ANOVA with levels of PGE<sub>2</sub> production at time 0 as a cofactor and time, horse identity, and treatment as factors, was performed for time-dependent analysis of

PGE<sub>2</sub> production. A value of  $P < 0.05$  was considered to be significant. The data were analyzed with software.<sup>ii</sup>

## **II.4. Results**

### **II.4.1. Experiment 1**

#### **II.4.1.1. IL-1 $\beta$ -dependent induction of PGE<sub>2</sub> production**

Equine articular chondrocytes produced low amounts of PGE<sub>2</sub> under non-stimulated culture conditions (control) or after stimulation with 2.5 ng/mL of rhIL-1 $\beta$  for 24 hours. There was a significant effect of rhIL-1 $\beta$  concentration on PGE<sub>2</sub> production ( $P < 0.001$ ). Post-hoc tests revealed that PGE<sub>2</sub> production was significantly lower in the chondrocyte group under non-stimulated culture conditions and in the group stimulated with 2.5 ng/mL of rhIL-1 $\beta$  than in the 5, 10 and 20 ng/mL stimulated groups ( $P = 0.01$ ).

#### **II.4.1.2. IL-1 $\beta$ -dependent induction of COX-2 and mPGES-1 mRNA expression**

Amounts of COX-2 and mPGES-1 mRNA were low or undetectable in non-stimulated culture conditions (control; 0 ng/mL; Fig 1). Cyclooxygenase-2 mRNA expression was induced by rhIL-1 $\beta$ . Likewise, mPGES-1 mRNA expression was also induced after rhIL-1 $\beta$  stimulation.

Results of experiment 1 indicated that rhIL-1 $\beta$  used at 5 ng/mL led to significant ( $P = 0.01$ ) production of PGE<sub>2</sub> in the media and induced COX-2 and mPGES-1 mRNA expression. Therefore, except for controls, subsequent chondrocyte cultures in experiment 2 were performed with 5 ng/mL rhIL-1 $\beta$ .

### **II.4.2. Experiment 2**

#### **II.4.2.1. Time-dependent regulation of PGE<sub>2</sub> production**

Control cells produced low or negligible amounts of PGE<sub>2</sub> between 0 and 24 hours of culture (Fig 2). In contrast, rhIL-1 $\beta$  stimulated PGE<sub>2</sub> production by equine chondrocytes cultured for 6 to 24 hours. A significant ( $P < 0.001$ ) effect of treatment and time on PGE<sub>2</sub> production was detected. Post-hoc tests revealed a significant ( $P < 0.001$ ) difference between treatment and control samples at all time points, except 3 hours after stimulation. The cumulative PGE<sub>2</sub> production increased progressively until 24 hours to attain a mean value of 368 ng/mL.

#### **II.4.2.2. Time-dependent expression of COX-2 and mPGES-1 mRNA**

The chondrocytes did not express COX-2 mRNA under control culture conditions (Fig 3). In contrast, a rapid induction of COX-2 mRNA was observed 3 hours after rhIL-1 $\beta$ , compared with controls, and this pattern of COX-2 expression was maintained throughout the 24 hour culture period. Similarly, chondrocytes expressed negligible amounts of microsomal PGES-1 transcript under control conditions, but stimulation with rhIL-1 $\beta$  induced mPGES-1 mRNA expression between 3 and 24 hours of culture.

#### **II.4.2.3. Time-dependent expression of COX-2 and mPGES-1 proteins**

Equine articular chondrocytes expressed low or negligible amounts of COX-2 or mPGES-1 proteins under control culture conditions (Fig 4). In contrast, a strong expression of COX-2 protein was observed after 12 and 24 hours of rhIL-1 $\beta$  stimulation. Similarly, induction of microsomal PGES-1 protein expression was revealed by use of western blot analysis after 12 and 24 hours following the rhIL-1 $\beta$  stimulation.

## II.5. Discussion

Results of this study provided evidence that the recently identified microsomal prostaglandin synthase, mPGES-1, a terminal enzyme in the arachidonic acid pathway, which metabolizes  $\text{PGH}_2$  to  $\text{PGE}_2$ , was inducible by the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and functionally linked with COX-2 in equine articular chondrocytes in monolayer culture. These results agreed with those recently published for human chondrocytes<sup>37</sup> affected by osteoarthritis and suggest that mPGES-1 could be a downstream therapeutic target for developing more selective blockade of  $\text{PGE}_2$  synthesis, thereby possibly avoiding adverse effects reported for COX-1 and COX-2 inhibitors.

The maximal induction of COX-2 mRNA observed at 3 hours after rhIL-1 $\beta$  stimulation and its sustained expression for at least 24 hours agreed with findings from earlier studies using normal human chondrocytes<sup>44,45</sup> and more recently, equine chondrocytes.<sup>15,39</sup> A significant increase in  $\text{PGE}_2$  concentrations was not observed until 6 hours after rhIL-1 $\beta$  treatment. The apparent delay observed between the rapid induction of COX-2 mRNA (3 hours after rhIL-1 $\beta$ ) and the detection of a significant increase in  $\text{PGE}_2$  production (6 hours after rhIL-1 $\beta$ ) was likely related to the time required for translation of COX-2 mRNA into COX-2 protein, and for accumulation of  $\text{PGE}_2$  into the culture media. This induction of COX-2 transcript was also associated with increased COX-2 protein, as observed by others.<sup>44</sup> In contrast, a more gradual increase in COX-2 induction was observed in IL-1 $\beta$ -stimulated human chondrocytes, with maximal concentrations observed only at 24 hours after stimulation.<sup>37</sup> This slower response in gene expression may be related to the normal versus disease status of the cells, to differences in IL-1 $\beta$  concentrations used among studies, to species differences, or the use of human IL-1 $\beta$  on equine cells. Collectively, these results may be relevant to the pathophysiology of osteoarthritis, because IL-1 $\beta$ -dependent COX-2-induction of  $\text{PGE}_2$  synthesis is thought to modulate cartilage destruction.<sup>21</sup> Furthermore, COX-2 can be induced by IL-1 $\beta$  in many tissues affected by osteoarthritis, including synovial fibroblasts, chondrocytes, meniscal chondrocyte-like cells and osteophytic chondrocytes,<sup>21</sup> delineating the importance of this inducible enzyme in the production of pathologic concentrations of  $\text{PGE}_2$  in joint disease.

The metabolism of arachidonic acid by COX-1 and COX-2 yields the intermediary product PGH<sub>2</sub>, which is rapidly converted into PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2A</sub>, PGI<sub>2</sub> or thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) by specific terminal synthases. Chondrocyte PGE<sub>2</sub> synthesis is markedly induced by IL-1β or TNF-α,<sup>37</sup> however, to our knowledge, expression of PGES has not been previously studied in equine articular tissues. In other species, the inducible form of the enzyme, mPGES-1, is upregulated by LPS, IL-1β and TNF-α.<sup>22</sup> Microsomal PGES-1 may therefore be an important enzyme in inflammatory events. The rapid expression of mPGES-1 mRNA after IL-1β stimulation in the present study suggests a role for the enzyme in early PGE<sub>2</sub>-dependent inflammatory events in equine joint disease. In a rat adjuvant-induced arthritis model, mPGES-1 is selectively up-regulated during COX-2-dependent PGE<sub>2</sub> production.<sup>36</sup> Following these recent findings, mPGES-1 was considered the isoform functionally linked to COX-2, responsible for the pathologic production of PGE<sub>2</sub> in vivo.<sup>31</sup> Additional lines of evidence for a major role of mPGES-1 in arthritis is provided by results of genetic studies in which mPGES-1-deficient mice evaluated in a collagen-induced arthritis model had a reduced inflammatory response and protection from cartilage and bone changes normally associated with this model.<sup>38</sup> An interesting possibility for therapeutic intervention is the eventual specific blockade of mPGES-1 expression by articular cells to treat inflammatory and degenerative joint diseases.

The profile of PGE<sub>2</sub> synthesis observed in the present study was in agreement with the previously reported temporal increase in PGE<sub>2</sub> production after IL-1β stimulation of normal chondrocytes.<sup>17,18,44,46</sup> Increased PGE<sub>2</sub> has been measured in equine joints with degenerative arthropathies<sup>47-49</sup> and reported to be a good to excellent predictor of pathologic findings in equine joints.<sup>10</sup> The potential role played by PGE<sub>2</sub> in the pathophysiology of osteoarthritis is emerging. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces chondrocyte apoptosis<sup>23-25</sup>, enhances production of MMPs,<sup>26</sup> and decreases the synthesis and promotes the degradation of proteoglycans in vitro.<sup>21</sup> Furthermore, it causes osteoclastic bone resorption and could alter subchondral bone in osteoarthritis.<sup>27,28</sup> Interestingly, PGE<sub>2</sub> also enhances its own IL-1β-induced production by rheumatoid synovial fibroblasts,<sup>50</sup> highlighting a potential positive feedback loop.

Paradoxically, beneficial effects of PGE<sub>2</sub> on joint structures have also been identified. The addition of exogenous PGE<sub>2</sub> to equine or human chondrocytes decreases the IL-1 $\beta$ -induced expression of MMP-1, MMP-3, MMP-13 and TIMP-1, indicating that PGE<sub>2</sub> could be beneficial in inflammatory joint diseases.<sup>51,52</sup> However, the concentrations of exogenous PGE<sub>2</sub> that provided an effect were in the nanogram per milliliter<sup>51</sup> to microgram per milliliter range.<sup>52</sup> Considering that the concentrations of PGE<sub>2</sub> detected in synovial fluids of equine arthropathies are in the picogram per milliliter range,<sup>47,49</sup> the clinical relevance of these putative beneficial effects will require further investigation. Other arachidonic acid metabolites appear to be important for the homeostasis of cartilage, as in other organs. The prostaglandin 15-deoxy-delta 12,14 PGJ<sub>2</sub>, a metabolite of the prostaglandin PGD<sub>2</sub>,<sup>53</sup> inhibits IL-1 $\beta$ -induced nitric oxide synthase expression and MMP-13 production in chondrocytes affected by osteoarthritis.<sup>54</sup> Similarly, PGJ<sub>2</sub> inhibits IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression by affected human chondrocytes.<sup>55</sup> Presently, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), commonly used to control inflammation in joint disease, block upstream enzymes in the arachidonic acid pathway and may concurrently block all potentially beneficial prostaglandins. The realization that COX-2 was a key enzyme in prostaglandin synthesis led to the development of COX-2 selective inhibitors. As serious adverse effects are recognized with their use, more selective inhibitors of PGE<sub>2</sub> synthesis may be clinically useful because they would spare the production of arachidonic acid metabolites which are important for the homeostasis of joints and many organs. Microsomal PGES-1 could be a potential candidate to achieve this goal.

The effect of the cytokine on all constituents of the equine joint, and well as the pathophysiologic consequence of COX-2 and mPGES-1 induction in equine chondrocytes, deserve further investigation. Selective blockade of mPGES-1 expression might provide an interesting therapeutic strategy for the control of PGE<sub>2</sub> production in equine joint diseases.



## **II.6. Acknowledgement**

We thank Nadine Bouchard and Hélène Richard for technical support and Guy Beauchamp for statistical assistance.

Judith Farley was supported by a scholarship from the Fonds du Centenaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. Jean Sirois is supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Investigator Award. Sheila Laverty is funded by the Canadian Arthritis Network (CAN).

Supported in part by grants from the Groupe de Recherche en Médecine  quine du Québec (GREMEQ), the Canadian Arthritis Network, and CIHR MT-13190.

## II.7. Footnotes

- <sup>a</sup> Trypsin Type I, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.
- <sup>b</sup> Collagenase Type IA, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.
- <sup>c</sup> DMEM powder, Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
- <sup>d</sup> Penicillin-streptomycin, Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
- <sup>e</sup> Gentamicin solution, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.
- <sup>f</sup> HEPES Buffer Solution, Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
- <sup>g</sup> EDTA, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ.
- <sup>h</sup> Fetal Bovine Serum, Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY.
- <sup>i</sup> Cell strainer with 70  $\mu$ m nylon mesh, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ.
- <sup>j</sup> Hausser Bright-Line Hemacytometer, Hausser Scientific, Horsham, PA.
- <sup>k</sup> Trypan Blue solution, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.
- <sup>l</sup> Costar 24 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated, Corning, NY.
- <sup>m</sup> 6-well plates, Sarstedt, Newton, NC.
- <sup>n</sup> 10 cm tissue culture dishes, Sarstedt, Newton, NC.
- <sup>o</sup> Recombinant human IL-1 $\beta$ , R&D Systems Inc., Minneapolis, MN.
- <sup>p</sup> PGE<sub>2</sub> antiserum, Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI.
- <sup>q</sup> Trizol reagent, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA.
- <sup>r</sup> Chloroform, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ.
- <sup>s</sup> Alcohol Anhydrous Reagent, J.T. Baker (Mallinckrodt Baker Inc.), Phillipsburg, NJ.
- <sup>t</sup> Diethyl pyrocarbonate, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.
- <sup>u</sup> Access RT-PCR System, Promega Corporation, Madison, WI.
- <sup>v</sup> Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada
- <sup>w</sup> QuikHyb Hybridization Solution, Stratagene, La Jolla, CA.
- <sup>x</sup> Storm 840, Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA.
- <sup>y</sup> Image Quant version 1.1, Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA.
- <sup>z</sup> Tris, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ.
- <sup>aa</sup> Diethyldithiocarbamic acid, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.
- <sup>bb</sup> TWEEN, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.

<sup>cc</sup> SDS-PAGE, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ.

<sup>dd</sup> Hybond-P, Amersham Biosciences (GE Health care), Little Chalfont, Buckinghamshire, England.

<sup>ee</sup> Anti-COX-2 antibody (MF 243), Merck Frosst Center for Therapeutic Research, Pointe-Claire-Dorval, Québec, Canada.

<sup>ff</sup> Anti-mPGES-1 antibody, Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI.

<sup>gg</sup> Anti-rabbit IgG, peroxidase-liked species-specific whole antibody (from donkey), Amersham Biosciences (GE Health care), Little Chalfont, Buckinghamshire, England.

<sup>hh</sup> ECL Plus, Amersham Biosciences (GE Health care), Little Chalfont, Buckinghamshire, England.

<sup>ii</sup> SAS version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

## II.8. References

1. Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:45-53.
2. Towle CA, Hung HH, Bonassar LJ, et al. Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:293-300.
3. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:2165-2174.
4. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001;44:1237-1247.
5. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:374-376.
6. Abramson SB, Attur M, Amin AR, et al. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:535-541.
7. Moos V, Fickert S, Muller B, et al. Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol* 1999;26:870-879.
8. Smith MD, Triantafillou S, Parker A, et al. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997;24:365-371.
9. Morris EA, McDonald BS, Webb AC, et al. Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. *Am J Vet Res* 1990;51:59-64.
10. Bertone AL, Palmer JL, Jones J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Vet Surg* 2001;30:528-538.
11. Attur MG, Patel IR, Patel RN, et al. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:65-72.
12. Inoue K, Masuko-Hongo K, Okamoto M, et al. Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. *Rheumatol Int* 2004.
13. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2002;21:251-262.
14. Sadowski T, Steinmeyer J. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:407-415.
15. Tung JT, Venta PJ, Eberhart SW, et al. Effects of anti-arthritis preparations on gene expression and enzyme activity of cyclooxygenase-2 in cultured equine chondrocytes. *Am J Vet Res* 2002;63:1134-1139.

16. Von Rechenberg B, McIlwraith CW, Akens MK, et al. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin(PGE<sub>2</sub>) and neutral metalloproteinases(NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Vet J* 2000;32:140-150.
17. May SA, Hooke RE, Lees P. Interleukin-1 stimulation of equine articular cells. *Res Vet Sci* 1992;52:342-348.
18. Takafuji VA, McIlwraith CW, Howard RD. Effects of equine recombinant interleukin-1alpha and interleukin-1beta on proteoglycan metabolism and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in equine articular cartilage explants. *Am J Vet Res* 2002;63:551-558.
19. Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H, et al. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 2001;167:469-474.
20. Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, et al. Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 2002;29:1836-1842.
21. Hardy MM, Seibert K, Manning PT, et al. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* 2002;46:1789-1803.
22. Fahmi H. mPGES-1 as a novel target for arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:623-627.
23. Miwa M, Saura R, Hirata S, et al. Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E<sub>2</sub> through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:17-24.
24. Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, et al. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol* 2001;28:2509-2519.
25. Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, et al. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E<sub>2</sub> via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2000;165:3402-3410.
26. Mehindate K, al-Daccak R, Dayer JM, et al. Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E<sub>2</sub>. Evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Immunol* 1995;155:3570-3577.
27. Saegusa M, Murakami M, Nakatani Y, et al. Contribution of membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase to bone resorption. *J Cell Physiol* 2003;197:348-356.
28. Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:623-627.
29. Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, et al. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:383-399.
30. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, et al. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biol Chem* 2000;275:32775-32782.

31. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000;275:32783-32792.
32. Serhan CN, Levy B. Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8609-8611.
33. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, et al. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7220-7225.
34. Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, et al. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:884-889.
35. Ouellet M, Falgoutyret JP, Ear PH, et al. Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. *Protein Expr Purif* 2002;26:489-495.
36. Claveau D, Sirinyan M, Guay J, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production in the rat adjuvant-induced arthritis model. *J Immunol* 2003;170:4738-4744.
37. Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, et al. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R355-365.
38. Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, et al. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9044-9049.
39. Tung JT, Fenton JI, Arnold C, et al. Recombinant equine interleukin-1beta induces putative mediators of articular cartilage degradation in equine chondrocytes. *Can J Vet Res* 2002;66:19-25.
40. Liu J, Antaya M, Boerboom D, et al. The delayed activation of the prostaglandin G/H synthase-2 promoter in bovine granulosa cells is associated with down-regulation of truncated upstream stimulatory factor-2. *J Biol Chem* 1999;274:35037-35045.
41. Brown KA, Boerboom D, Bouchard N, et al. Human chorionic gonadotropin-dependent regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 in preovulatory follicles and its potential role in follicular luteinization. *Endocrinology* 2004;145:1906-1915.
42. Filion F, Bouchard N, Goff AK, et al. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J Biol Chem* 2001;276:34323-34330.
43. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
44. Geng Y, Blanco F, Cornelisson M, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol* 1995;155:796-801.
45. Blanco FJ, Guitian R, Moreno J, et al. Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1999;26:1366-1373.

46. May SA, Hooke RE, Lees P. Equine chondrocyte activation by a variety of stimuli. *Br Vet J* 1992;148:389-397.
47. Gibson KT, Hodge H, Whittem T. Inflammatory mediators in equine synovial fluids. *Aust Vet J* 1996;73:148-151.
48. Hawkins DL, MacKay RJ, Gum GG, et al. Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6, and prostaglandin E2 values in horses. *Am J Vet Res* 1993;54:379-386.
49. Kirker-Head CA, Chandna VK, Agarwal RK, et al. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. *Am J Vet Res* 2000;61:714-718.
50. Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, et al. Prostaglandin E2 is an enhancer of interleukin-1beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48:2819-2828.
51. DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Fujimoto N, et al. Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest* 1994;71:270-278.
52. Tung JT, Arnold CE, Alexander LH, et al. Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *Am J Vet Res* 2002;63:987-993.
53. Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses in arthritis. An overview. *J Rheumatol* 2002;29:3-14.
54. Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, et al. Peroxisome proliferator--activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001;44:595-607.
55. Fahmi H, Pelletier JP, Mineau F, et al. 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:845-848.

## II.9. Figure legends

### Figure 1

Gel electrophoretogram of cyclooxygenase-2 (COX-2), microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation with various concentrations of recombinant human interleukin-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ).

### Figure 2

Mean  $\pm$  SEM concentrations of PGE<sub>2</sub> obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation with rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) or without rhIL-1 $\beta$  (control). \*Significantly ( $P < 0.001$ ) different from control value.

### Figure 3

Gel electrophoretogram of COX-2, mPGES-1, and GADPH obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation without ( - ) or with ( + ) rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for various periods.

### Figure 4

Western blot analysis of COX-2 and mPGES-1 obtained from cultured equine articular chondrocytes after stimulation without ( - ) or with ( + ) rhIL-1 $\beta$  (5 ng/mL) for 0, 12 , or 24 hours.



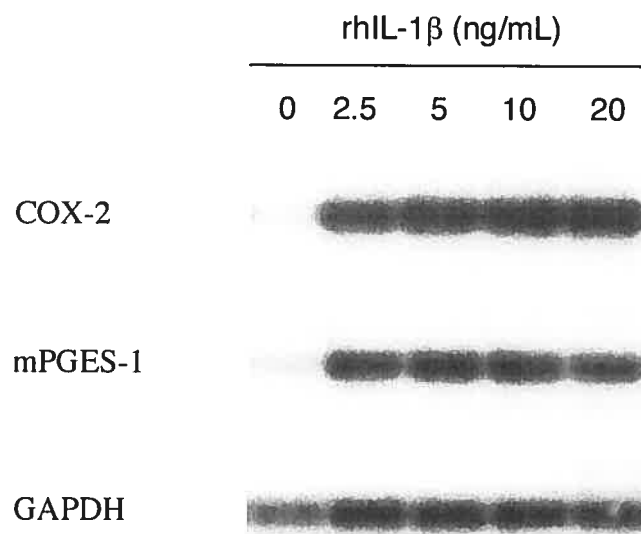
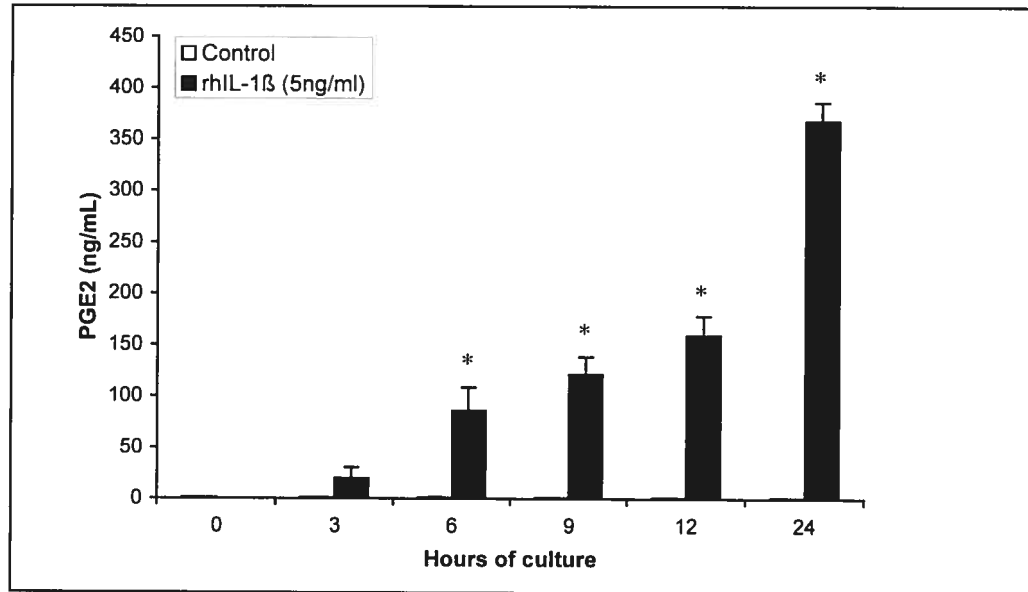
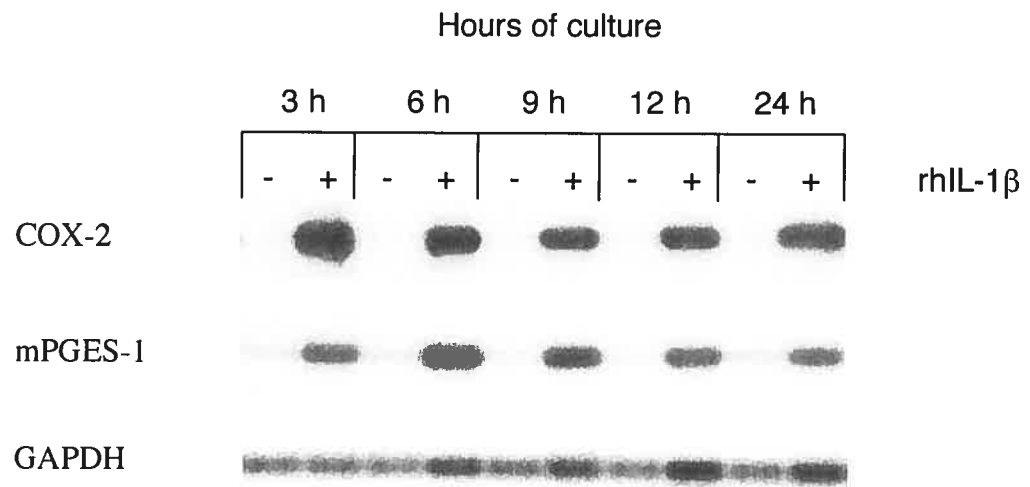
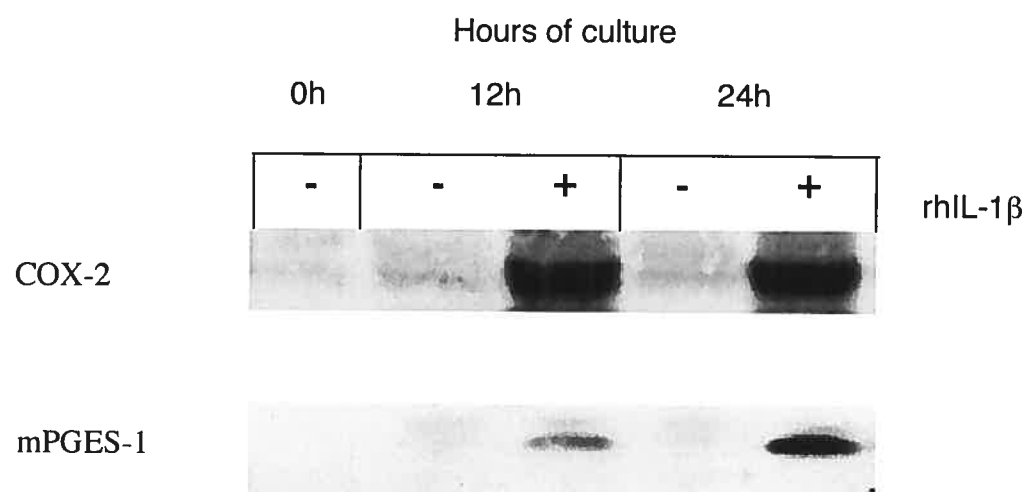
**Figure 1**

Figure 2



**Figure 3**

**Figure 4**

### Chapitre III : Discussion

Les résultats de cette étude démontrent que la mPGES-1, une enzyme terminale dans la cascade de l'acide arachidonique et métabolisant la PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>, est inductible par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  et couplée à la COX-2 chez des chondrocytes articulaires équins en culture en monocouche. Ces résultats, semblables à ceux d'une étude récemment publiée au sujet de chondrocytes humains souffrant d'ostéoarthrose (Kojima *et al.* 2004), suggèrent que la mPGES-1, par le fait qu'elle est une enzyme terminale, pourrait devenir une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'ostéoarthrose. Le blocage spécifique de cette enzyme aurait comme effet l'inhibition de la synthèse de la PGE<sub>2</sub> de façon plus sélective que celle obtenue avec les inhibiteurs de la COX-1 et/ou de la COX-2, ayant comme avantage la réduction ou l'élimination des effets secondaires engendrés par ces médicaments.

L'induction maximale de l'expression de l'ARNm de la COX-2, observée trois heures suivant la stimulation avec la rhIL-1 $\beta$  et soutenue pour une période d'au moins 24 heures, a également été observée chez des chondrocytes humains normaux (Geng *et al.* 1995; Blanco *et al.* 1999) et plus récemment, chez des chondrocytes équins normaux (Tung *et al.* 2002b; Tung *et al.* 2002c). Cependant, dans notre étude une augmentation significative des concentrations de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture n'était observable que six heures après le traitement par la rhIL-1 $\beta$ . Le délai observé entre l'induction rapide de l'expression de l'ARNm de la COX-2 (trois heures suivant la stimulation) et la détection d'une augmentation significative de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture (six heures suivant la stimulation) pourrait être relié au temps requis pour la traduction de l'ARNm de la COX-2 en protéine, et pour l'accumulation de la PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture. Cette induction de l'expression de l'ARNm de la COX-2 a été associée à une augmentation de l'expression de la protéine COX-2, phénomène également observé dans d'autres études (Geng *et al.* 1995). Par contre, chez des chondrocytes humains souffrant d'ostéoarthrose stimulés par l'IL-1 $\beta$ , une induction plus graduelle de l'expression de la COX-2, avec des niveaux d'expression maximaux observés seulement 24 heures suivant la stimulation, a été observée (Kojima *et al.* 2004). Cette induction plus lente de l'expression génique peut être reliée à plusieurs facteurs : à la

différence entre les cellules saines et les cellules souffrant d'ostéoarthrose et entre les concentrations d'IL-1 $\beta$  utilisées selon les études, aux variations entre les espèces, ou à l'utilisation de rhIL-1 $\beta$  dans des cultures de chondrocytes équins.

Pris de façon collective, ces résultats favorisent une meilleure compréhension de la pathogénie de l'ostéoarthrose, la production de PGE<sub>2</sub> suivant l'induction enzymatique de la COX-2 étant maintenant reconnue comme importante dans les mécanismes de destruction du cartilage (Hardy *et al.* 2002). De plus, il a également été démontré que la COX-2 peut être induite par l'IL-1 $\beta$  au sein de plusieurs tissus, incluant les fibroblastes synoviaux, les chondrocytes articulaires, les chondrocytes méniscaux et les chondrocytes ostéophytiques (Hardy *et al.* 2002), démontrant ainsi l'importance de cette enzyme dans la production de PGE<sub>2</sub> en concentrations pathologiques lors de maladies articulaires.

Le métabolisme de l'acide arachidonique par la COX-1 et la COX-2 conduit à la production de la PGH<sub>2</sub>, un produit intermédiaire rapidement converti en PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> ou TXA<sub>2</sub> par des synthétases terminales spécifiques. Certaines études ont démontré que la production de PGE<sub>2</sub> par les chondrocytes est induite de façon importante par l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Kojima *et al.* 2004). Cependant, au meilleur de notre connaissance, l'expression de la PGES n'a jamais été étudiée dans des tissus articulaires équins. Chez d'autres espèces, il a été démontré que la forme inductible de l'enzyme, la mPGES-1, est régulée par les LPS, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Fahmi 2004). La mPGES-1 pourrait donc être une enzyme importante lors de processus inflammatoires. Dans l'étude présente, l'induction rapide de l'expression de l'ARNm de la mPGES-1 suivant la stimulation par l'IL-1 $\beta$  suggère un rôle pour cette enzyme dans les événements inflammatoires précoces dépendants de la PGE<sub>2</sub> rencontrés lors de maladies articulaires équines. Dans le modèle murin d'arthrite induite par des adjuvants, une augmentation de l'expression de la mPGES-1 a été observée durant la production de PGE<sub>2</sub> dépendante de la COX-2 (Claveau *et al.* 2003). À la suite de ces récentes découvertes, la mPGES-1 a été considérée comme l'enzyme fonctionnellement liée à la COX-2 et par conséquent, celle responsable de la production pathologique de PGE<sub>2</sub> *in vivo* (Murakami *et al.* 2000). D'autres évidences d'un rôle majeur joué par la mPGES-1 dans la pathogénie de l'ostéoarthrose ont été fournies par des études génétiques dans

lesquelles des souris déficientes en mPGES-1 étaient évaluées dans un modèle d'arthrite induite par le collagène. En effet, ces souris ont démontré une réduction dans leur réponse inflammatoire et une protection de leurs articulations contre les changements cartilagineux et osseux normalement associés à ce modèle (Trebino *et al.* 2003). L'inhibition spécifique de l'expression de la mPGES-1 comme traitement contre les maladies articulaires dégénératives et inflammatoires devient par le fait même, une avenue thérapeutique intéressante.

Le profil de synthèse de la PGE<sub>2</sub> observé dans l'étude présente est semblable à celui d'un rapport précédent évaluant l'augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> suite à une stimulation par l'IL-1 $\beta$  chez des chondrocytes normaux (May *et al.* 1992b, a; Geng *et al.* 1995; Takafuji *et al.* 2002). Démontrant l'importance de la PGE<sub>2</sub>, une concentration augmentée de cet écosanoïde a été trouvée dans les articulations de chevaux souffrant d'arthropathies dégénératives (Hawkins *et al.* 1993; Gibson *et al.* 1996; Kirker-Head *et al.* 2000) et a été considérée comme un bon à excellent indicateur de maladies articulaires chez cette espèce (Bertone *et al.* 2001).

Le rôle potentiellement joué par la PGE<sub>2</sub> dans la pathogénie de l'ostéoarthrose est en émergence. Il a été démontré que la PGE<sub>2</sub> possède la capacité d'induire l'apoptose des chondrocytes (Miwa *et al.* 2000; Notoya *et al.* 2000; Pelletier *et al.* 2001a) et la production des MMP (Mehindate *et al.* 1995), tout en provoquant la diminution de synthèse et l'augmentation de dégradation des protéoglycanes *in vitro* (Hardy *et al.* 2002). Elle peut également causer de la résorption osseuse et des altérations de l'os sous-chondral lors d'ostéoarthrose (Laufer 2003; Saegusa *et al.* 2003). Fait intéressant, la PGE<sub>2</sub> peut aussi favoriser la production d'IL-1 $\beta$  par les fibroblastes synoviaux souffrant d'arthrite rhumatoïde (Kojima *et al.* 2003), démontrant ainsi son action au sein d'une boucle de rétrocontrôle positif.

Paradoxalement, des effets bénéfiques de la PGE<sub>2</sub> sur les structures articulaires ont aussi été identifiés. L'ajout de PGE<sub>2</sub> exogène à des chondrocytes équins ou humains a comme effet la diminution de l'expression des MMP-1, -3, -13 et TIMP-1 induite par l'IL-1 $\beta$ , indiquant que la PGE<sub>2</sub> pourrait également avoir des effets bénéfiques lors de maladies articulaires inflammatoires (DiBattista *et al.* 1994; Tung *et al.* 2002a).

Cependant, les concentrations de PGE<sub>2</sub> exogène utilisées dans ces études, et ayant eu un effet bénéfique sur les tissus, vont de l'ordre du nanogramme par millilitre (DiBattista *et al.* 1994) à l'ordre du microgramme par millilitre (Tung *et al.* 2002a). Considérant que les concentrations de PGE<sub>2</sub> détectées dans le liquide synovial de chevaux souffrant d'arthropathies sont en terme de picogrammes par millilitre (Gibson *et al.* 1996; Kirker-Head *et al.* 2000), de futures investigations seront nécessaires pour déterminer l'importance clinique de ces effets bénéfiques.

D'autres métabolites provenant de la cascade de l'acide arachidonique semblent importants pour l'homéostasie du cartilage et des autres organes. La prostaglandine 15-déoxy-delta 12, 14 PGJ<sub>2</sub>, un métabolite de la PGD<sub>2</sub> (Fahmi *et al.* 2002a), peut inhiber l'expression de la synthétase de l'oxyde nitrique induite par l'IL-1 $\beta$  et la production de la MMP-13 par des chondrocytes ostéoarthritiques (Fahmi *et al.* 2001). De façon similaire, la PGJ<sub>2</sub> est capable de l'inhibition de la production de la PGE<sub>2</sub> induite par l'IL-1 $\beta$  et de l'expression de la COX-2 par des chondrocytes humains souffrant d'ostéoartrrose (Fahmi *et al.* 2002b).

Jusqu'à présent, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) communément utilisés pour contrôler l'inflammation lors de maladies articulaires, ont pour fonction le blocage des enzymes situées en amont de la cascade de l'acide arachidonique, inhibant par le fait même de façon non sélective la production de prostaglandines potentiellement bénéfiques. La découverte de la COX-2 comme enzyme clé dans la synthèse des prostaglandines a mené au développement de ses inhibiteurs sélectifs. Depuis la mise en évidence d'effets secondaires graves associés à l'utilisation des anti-COX-2, la recherche d'inhibiteurs plus spécifiques de la synthèse de PGE<sub>2</sub> pourra s'avérer cliniquement utile, épargnant ainsi la production des autres métabolites de l'acide arachidonique importants pour l'homéostasie des articulations et de plusieurs autres organes. La mPGES-1 pourrait, par le fait même, devenir un candidat potentiel pour l'atteinte de ce but.

Cette étude nous a permis d'acquérir de nouvelles connaissances au sujet de l'expression et de la régulation de la mPGES-1 chez des chondrocytes équins normaux. Cependant, il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'un modèle d'ostéoartrrose *in vitro*, comportant évidemment certaines limitations. L'utilisation d'IL-1 $\beta$  recombinante



humaine, la recombinante équine n'étant pas disponible commercialement au moment de la réalisation de l'étude en 2001, est peut être à l'origine de légères variations dans le profil d'expression génique de la mPGES-1. Cependant, bien qu'il ait déjà été suggéré que les chondrocytes équins sont plus sensibles à une stimulation par des cytokines en provenance de chevaux que d'humains (May *et al.* 1992b), une étude comparant la stimulation de chondrocytes équins par l'IL-1 recombinante équine (reIL-1 $\beta$ ) et la rhIL-1 $\beta$  a échoué dans la démonstration d'une différence de réponse *in vitro*, la séquence génique du récepteur cellulaire d'IL-1 $\beta$  pouvant être très bien conservée entre les espèces (Tung *et al.* 2002b). De futures études comparatives seront donc nécessaires pour déterminer si différence il y a dans l'expression génique de la mPGES-1.

Notre étude caractérise l'expression de la mPGES-1 chez des chondrocytes. Or, nous savons que d'autres cellules sont impliquées dans la pathogénie de l'ostéoarthrose (Hardy *et al.* 2002). Il serait donc intéressant de répéter la même expérience avec des cellules provenant des autres tissus articulaires, pour en déterminer leur implication dans la production de concentrations pathologiques de PGE<sub>2</sub>.

L'utilisation du modèle *in vitro* d'ostéoarthrose appliquant des forces de compression intermittentes aux cultures cellulaires de chondrocytes deviendra intéressante dans l'étude de l'implication de la mPGES-1 dans les phénomènes précoces d'inflammation articulaire (Sauerland *et al.* 2003). Le cas échéant, la découverte de médicaments inhibiteurs spécifiques de la mPGES-1 en deviendront encore plus intéressants.

Nous ne savons pas jusqu'à quel degré les études *in vitro* reflètent ce qui se passe réellement *in vivo*, le comportement cellulaire pouvant être modifié par la perte de leur environnement physiologique. Ayant été réalisée tout récemment en médecine humaine (Li *et al.* 2005), l'étude de l'expression de la mPGES-1 *in situ* dans des tissus articulaires de chevaux normaux et souffrant d'ostéoarthrose nous donnera de l'information précieuse concernant la localisation et l'ampleur de l'expression de la mPGES-1 lors de pathologie.

## Conclusion

En conclusion, cette étude caractérise l'effet de la rhIL-1 $\beta$  sur l'expression de la COX-2 et de la mPGES-1, et la régulation de la PGE<sub>2</sub>, chez des chondrocytes équins normaux en culture en monocouche. Elle apporte donc de nouvelles informations concernant, chez l'espèce équine, la co-induction de la COX-2 et de la mPGES-1 suite à une stimulation pro-inflammatoire, conduisant à une augmentation de la synthèse de la PGE<sub>2</sub>, un écosanoïde impliqué dans la pathogénie de l'ostéoarthrose.

Les compagnies pharmaceutiques sont présentement à la recherche de nouveaux médicaments contre l'ostéoarthrose qui seront plus efficaces et comporteront moins d'effets secondaires. L'inhibition sélective de l'expression de la mPGES-1 pourra peut-être apporter une stratégie thérapeutique intéressante dans le contrôle de la production de la PGE<sub>2</sub> dans les pathologies articulaires. La chasse à l'inhibiteur sélectif de la mPGES-1 est maintenant ouverte, restera ensuite à démontrer l'efficacité et l'innocuité de ces nouvelles molécules.

## Bibliographie

Abramson, S.B., Attur, M., Amin, A.R. and Clancy, R. (2001) Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 3:535-41.

Adolphe, M. and Benoit, B. (1994) [Human articular chondrocyte culture. Value in pharmacotoxicology]. *Ann Pharm Fr* 52:177-83.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts K. and Watson, J.D. (1994) In : *Molecular biology of the cell* 3rd ed. Garland Publishing, New York. p 1294.

Amat, M., Diaz, C. and Vila, L. (1998) Leukotriene A4 hydrolase and leukotriene C4 synthase activities in human chondrocytes: transcellular biosynthesis of Leukotrienes during granulocyte-chondrocyte interaction. *Arthritis Rheum* 41:1645-51.

Amin, A.R., Attur, M. and Abramson, S.B. (1999) Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 11:202-9.

Attur, M.G., Patel, I.R., Patel, R.N., Abramson, S.B. and Amin, A.R. (1998) Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* 110:65-72.

Berenbaum, F., Jacques, C., Thomas, G., Corvol, M.T., Bereziat, G. and Masliah, J. (1996) Synergistic effect of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on PGE2 production by articular chondrocytes does not involve PLA2 stimulation. *Exp Cell Res* 222:379-84.

Bertone, A.L., Palmer, J.L. and Jones, J. (2001) Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Vet Surg* 30:528-38.

Bidgood, M.J., Jamal, O.S., Cunningham, A.M., Brooks, P.M. and Scott, K.F. (2000) Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes. *J Immunol* 165:2790-7.

Binette, F., McQuaid, D.P., Haudenschild, D.R., Yaeger, P.C., McPherson, J.M. and Tubo, R. (1998) Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 16:207-16.

Blanco, F. (1999) Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7:308-9.

Blanco, F.J., Guitian, R., Moreno, J., de Toro, F.J. and Galdo, F. (1999) Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 26:1366-73.

Bonnet, C., Bertin, P., Cook-Moreau, J., Chable-Rabinovitch, H., Treves, R. and Rigaud, M. (1995) Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells. *Prostaglandins* **50**:127-35.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.

Brater, D.C. (2002) Renal effects of cyclooxygenase-2-selective inhibitors. *J Pain Symptom Manage* **23**:S15-20.

Brown, K.A., Boerboom, D., Bouchard, N., Doré, M., Lussier, J.G. and Sirois, J. (2004) Human chorionic gonadotropin-dependent regulation of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 4 in preovulatory follicles and its potential role in follicular luteinization. *Endocrinology* **145**:1906-15.

Carroll, G.J. and Bell, M.C. (1993) Leukaemia inhibitory factor stimulates proteoglycan resorption in porcine articular cartilage. *Rheumatol Int* **13**:5-8.

Cawston, T. (1998) Tissue destruction and repair. In: *Rheumatology*, 2<sup>nd</sup> ed. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 1.8.1-1.8.6.

Claveau, D., Sirinyan, M., Guay, J., Gordon, R., Chan, C.C., Bureau, Y., Riendeau, D. and Mancini, J.A. (2003) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production in the rat adjuvant-induced arthritis model. *J Immunol* **170**:4738-44.

Clegg, P.D. and Carter, S.D. (1999) Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases. *Equine Vet J* **31**:324-30.

Costello, P.B., Baer, A.N. and Green, F.A. (1992) Lipoxygenase products in inflammatory synovial fluids and other exudates. *Ann Rheum Dis* **51**:1215-8.

Couchman, J.R. (2001) Structure, function, and biology of joint proteoglycans. In: *Arthritis and allied conditions- A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 209-25.

Dai, S.M., Shan, Z.Z., Nishioka, K. and Yudoh, K. (2005) Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal. *Ann Rheum Dis* **64**:735-42.

Davies, N.M. and Jamali, F. (2004) COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. *J Pharm Pharm Sci* **7**:332-6.

Davis, B.J., Lennard, D.E., Lee, C.A., Tiano, H.F., Morham, S.G., Wetsel, W.C. and Langenbach, R. (1999) Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology* **140**:2685-95.

Dewire, P. and Einhorn, T.A. (2001) The joint as an organ. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management* 3rd Edition ed. R. Zorab editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 49-68.

Di Battista, J.A., Dore, S., Martel-Pelletier, J. and Pelletier, J.P. (1996) Prostaglandin E2 stimulates incorporation of proline into collagenase digestible proteins in human articular chondrocytes: identification of an effector autocrine loop involving insulin-like growth factor I. *Mol Cell Endocrinol* **123**:27-35.

Di Battista, J.A., Dore, S., Morin, N., He, Y., Pelletier, J.P. and Martel-Pelletier, J. (1997) Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes. *J Cell Biochem* **65**:408-19.

DiBattista, J.A., Dore, S., Morin, N. and Aribat, T. (1996) Prostaglandin E2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem* **63**:320-33.

DiBattista, J.A., Martel-Pelletier, J., Fujimoto, N., Obata, K., Zafarullah, M. and Pelletier, J.P. (1994) Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest* **71**:270-8.

Dodge, G.R., Diaz, A., Sanz-Rodriguez, C., Reginato, A.M. and Jimenez, S.A. (1998) Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on the expression of the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes. *Arthritis Rheum* **41**:274-83.

Fahmi, H. (2004) mPGES-1 as a novel target for arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **16**:623-7.

Fahmi, H., Di Battista, J.A., Pelletier, J.P., Mineau, F., Ranger, P. and Martel-Pelletier, J. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* **44**:595-607.

Fahmi, H., Pelletier, J.P. and Martel-Pelletier, J. (2002a) PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses in arthritis. An overview. *J Rheumatol* **29**:3-14.

Fahmi, H., Pelletier, J.P., Mineau, F. and Martel-Pelletier, J. (2002b) 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **10**:845-8.

- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* **8**:2-10.
- Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J. and Pelletier, J.P. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* **39**:237-46.
- Filion, F., Bouchard, N., Goff, A.K., Lussier, J.G. and Sirois, J. (2001) Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J Biol Chem* **276**:34323-30.
- Flannery, C.R., Little, C.B., Hughes, C.E., Curtis, C.L., Caterson, B. and Jones, S.A. (2000) IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Matrix Biol* **19**:549-53.
- Freshney, R. (1990) In: *Culture of animal cells, A manual of basic technique* 2nd Edition Wiley-Liss, New York. p 397.
- Freyria, A.M., Cortial, D., Ronziere, M.C., Guerret, S. and Herbage, D. (2004) Influence of medium composition, static and stirred conditions on the proliferation of and matrix protein expression of bovine articular chondrocytes cultured in a 3-D collagen scaffold. *Biomaterials* **25**:687-97.
- Furst, D.E. and Hillson, J. (2001) Aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs. In: *Arthritis and allied conditions- A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 665-716.
- Geng, Y., Blanco, F., Cornelisson, M. and Lotz, M. (1995) Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol* **155**:796-801.
- Giannitsis, E. (2005) Rationale for testing the cardiovascular risk for patients with COX-2 inhibitors on the basis of biomarker NT-proBNP. *Clin Lab* **51**:63-83.
- Gibson, K.T., Hodge, H. and Whitem, T. (1996) Inflammatory mediators in equine synovial fluids. *Aust Vet J* **73**:148-51.
- Glowacki, J., Trepman, E. and Folkman, J. (1983) Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* **172**:93-8.
- Goldring, M.B. (2000) The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **43**:1916-26.
- Gregory, K.E., Keene, D.R., Tufa, S.F., Lunstrum, G.P. and Morris, N.P. (2001) Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. *J Bone Miner Res* **16**:2005-16.

Haeggstrom, J.Z. and Wetterholm, A. (2002) Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. *Cell Mol Life Sci* **59**:742-53.

Hardy, M.M., Seibert, K., Manning, P.T., Currie, M.G., Woerner, B.M., Edwards, D., Koki, A. and Tripp, C.S. (2002) Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* **46**:1789-803.

Hauselmann, H.J., Fernandes, R.J., Mok, S.S., Schmid, T.M., Block, J.A., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E. and Thonar, E.J. (1994) Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* **107** ( Pt 1):17-27.

Hawkins, D.L., MacKay, R.J., Gum, G.G., Colahan, P.T. and Meyer, J.C. (1993) Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6, and prostaglandin E2 values in horses. *Am J Vet Res* **54**:379-86.

He, W., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., Laufer, S. and Di Battista, J.A. (2002) Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol* **29**:546-53.

Hedbom, E. and Hauselmann, H.J. (2002) Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* **59**:45-53.

Henrotin, Y. and Reginster, J.-Y. (1999) Anabolic events in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**:310-2.

Henrotin, Y.E., De Groote, D.D., Labasse, A.H., Gaspar, S.E., Zheng, S.X., Geenen, V.G. and Reginster, J.Y. (1996) Effects of exogenous IL-1 beta, TNF alpha, IL-6, IL-8 and LIF on cytokine production by human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **4**:163-73.

Hering, T.M., Kollar, J., Huynh, T.D., Varelas, J.B. and Sandell, L.J. (1994) Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys* **314**:90-8.

Honorati, M.C., Bovara, M., Cattini, L., Piacentini, A. and Facchini, A. (2002) Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **10**:799-807.

Huch, K., Stove, J., Puhl, W. and Gunther, K.P. (2002) [Review and comparison of culture-techniques for articular chondrocytes]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* **140**:145-52.

Inoue, K., Masuko-Hongo, K., Okamoto, M. and Nishioka, K. (2004) Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. *Rheumatol Int*.

Jacques, C., Bereziat, G., Humbert, L., Olivier, J.L., Corvol, M.T., Masliah, J. and Berenbaum, F. (1997) Posttranscriptional effect of insulin-like growth factor-I on interleukin-1beta-induced type II-secreted phospholipase A2 gene expression in rabbit articular chondrocytes. *J Clin Invest* **99**:1864-72.

Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R. and Samuelsson, B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7220-5.

Jasser, M.Z., Mitchell, P.G. and Cheung, H.S. (1994) Induction of stromelysin-1 and collagenase synthesis in fibrochondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *Matrix Biol* **14**:241-9.

Joosten, L.A., Smeets, R.L., Koenders, M.I., van den Bersselaar, L.A., Helsen, M.M., Oppers-Walgreen, B., Lubberts, E., Iwakura, Y., van de Loo, F.A. and van den Berg, W.B. (2004) Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction. *Am J Pathol* **165**:959-67.

Jortikka, M.O., Parkkinen, J.J., Inkinen, R.I., Karner, J., Jarvelainen, H.T., Nelimarkka, L.O., Tammi, M.I. and Lammi, M.J. (2000) The role of microtubules in the regulation of proteoglycan synthesis in chondrocytes under hydrostatic pressure. *Arch Biochem Biophys* **374**:172-80.

Kirker-Head, C.A., Chandna, V.K., Agarwal, R.K., Morris, E.A., Tidwell, A., O'Callaghan, M.W., Rand, W. and Kumar, M.S. (2000) Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. *Am J Vet Res* **61**:714-8.

Knorth, H., Dorfmuller, P., Lebert, R., Schmidt, W.E., Wittenberg, R.H., Heukamp, M., Wiese, M. and Willburger, R.E. (2004) Participation of cyclooxygenase-1 in prostaglandin E2 release from synovitis tissue in primary osteoarthritis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **12**:658-66.

Kojima, F., Kato, S. and Kawai, S. (2005) Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol* **19**:255-61.

Kojima, F., Naraba, H., Miyamoto, S., Beppu, M., Aoki, H. and Kawai, S. (2004) Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **6**:R355-65.

Kojima, F., Naraba, H., Sasaki, Y., Beppu, M., Aoki, H. and Kawai, S. (2003) Prostaglandin E2 is an enhancer of interleukin-1beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **48**:2819-28.



Kojima, F., Naraba, H., Sasaki, Y., Okamoto, R., Koshino, T. and Kawai, S. (2002) Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* **29**:1836-42.

Kuettner, K., Thonar, E.J.-M.A. (1998) Osteoarthritis and related disorders: cartilage integrity and homeostasis. In: *Rheumatology* 2<sup>nd</sup> ed. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 8.6.1-8.6.16.

Kuwata, H., Nakatani, Y., Murakami, M. and Kudo, I. (1998) Cytosolic phospholipase A2 is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A2 that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* **273**:1733-40.

Kuwata, H., Nonaka, T., Murakami, M. and Kudo, I. (2005) Search of factors that intermediate cytokine-induced group IIA phospholipase A2 expression through the cytosolic phospholipase A2- and 12/15-lipoxygenase-dependent pathway. *J Biol Chem*.

Langelier, E., Suetterlin, R., Hoemann, C.D., Aebi, U. and Buschmann, M.D. (2000) The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem* **48**:1307-20.

Laufer, S. (2003) Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **15**:623-7.

Lazarus, M., Kubata, B.K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y. and Hayaishi, O. (2002) Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. *Arch Biochem Biophys* **397**:336-41.

Lee, R.B. and Urban, J.P. (2002) Functional replacement of oxygen by other oxidants in articular cartilage. *Arthritis Rheum* **46**:3190-200.

Lefebvre, V., Peeters-Joris, C. and Vaes, G. (1990) Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* **1052**:366-78.

Li, X., Afif, H., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P. and Fahmi, H. (2005) Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol* **32**:887-95.

Liacini, A., Sylvester, J., Li, W.Q. and Zafarullah, M. (2002) Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* **21**:251-62.

Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M. and Dey, S.K. (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91**:197-208.

Liu, J., Antaya, M., Boerboom, D., Lussier, J.G., Silversides, D.W. and Sirois, J. (1999) The delayed activation of the prostaglandin G/H synthase-2 promoter in bovine granulosa cells is associated with down-regulation of truncated upstream stimulatory factor-2. *J Biol Chem* **274**:35037-45.

Lotz, M.K. (2001) Cytokines and their receptors. In: *Arthritis and allied conditions- A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p 436-77.

Lyons-Giordano, B., Pratta, M.A., Galbraith, W., Davis, G.L. and Arner, E.C. (1993) Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *Exp Cell Res* **206**:58-62.

MacDonald, M.H. and Benton, H.P. (1996) Cellular responses and receptor mechanisms in joint disease: a bacterial lipopolysaccharide-induced model of articular damage. In: *Joint disease in the horse*. GW Trotter, editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 447-67.

Martel-Pelletier, J. (2004) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12 Suppl A**:S31-3.

Martel-Pelletier, J., Alaaeddine, N. and Pelletier, J.P. (1999) Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* **4**:D694-703.

Martel-Pelletier, J., Di Battista, J.A., Lajeunesse, D. and Pelletier, J.P. (1998) IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* **47**:90-100.

Martel-Pelletier, J., Mineau, F., Fahmi, H., Laufer, S., Reboul, P., Boileau, C., Lavigne, M. and Pelletier, J.P. (2004) Regulation of the expression of 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase and the synthesis of leukotriene B(4) in osteoarthritic chondrocytes: role of transforming growth factor beta and eicosanoids. *Arthritis Rheum* **50**:3925-33.

Masuko-Hongo, K., Berenbaum, F., Humbert, L., Salvat, C., Goldring, M.B. and Thirion, S. (2004) Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis Rheum* **50**:2829-38.

Matsukawa, A., Yoshimura, T., Maeda, T., Ohkawara, S., Takagi, K. and Yoshinaga, M. (1995) Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits. IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo. *J Immunol* **154**:5418-25.

- May, S.A., Hooke, R.E. and Lees, P. (1992a) Equine chondrocyte activation by a variety of stimuli. *Br Vet J* **148**:389-97.
- May, S.A., Hooke, R.E. and Lees, P. (1992b) Interleukin-1 stimulation of equine articular cells. *Res Vet Sci* **52**:342-8.
- Mayne, R., Vail, M.S., Mayne, P.M. and Miller, E.J. (1976) Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:1674-8.
- McIlwraith, C.W. (1996) General pathobiology of the joint and response to injury. In: *Joint disease in the horse*. GW Trotter, editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 40-70.
- Mehindate, K., al-Daccak, R., Dayer, J.M., Kennedy, B.P., Kris, C., Borgeat, P., Poubelle, P.E. and Mourad, W. (1995) Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E2. Evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2. *J Immunol* **155**:3570-7.
- Melchiorri, C., Meliconi, R., Frizziero, L., Silvestri, T., Pulsatelli, L., Mazzetti, I., Borzi, R.M., Uguccioni, M. and Facchini, A. (1998) Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **41**:2165-74.
- Miwa, M., Saura, R., Hirata, S., Hayashi, Y., Mizuno, K. and Itoh, H. (2000) Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E2 through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* **8**:17-24.
- Molloy, E.S. and McCarthy, G.M. (2005) Eicosanoids, osteoarthritis, and crystal deposition diseases. *Curr Opin Rheumatol* **17**:346-50.
- Moos, V., Fickert, S., Muller, B., Weber, U. and Sieper, J. (1999) Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol* **26**:870-9.
- Morrisset, S., Patry, C., Lora, M. and de Brum-Fernandes, A.J. (1998) Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1alpha, tumor necrosis factor-alpha, glucocorticoids, and 17beta-estradiol. *J Rheumatol* **25**:1146-53.
- Morris, E.A., McDonald, B.S., Webb, A.C. and Rosenwasser, L.J. (1990) Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. *Am J Vet Res* **51**:59-64.
- Morris, E.A. and Treadwell, B.V. (1994) Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res* **55**:138-46.

- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L. and Reddi, A.H. (2003) Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:155-74.
- Murakami, M. and Kudo, I. (2004) Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* **43**:3-35.
- Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K. and Kudo, I. (2003) Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* **278**:37937-47.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Tanioka, T. and Kudo, I. (2002) Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:383-99.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S. and Kudo, I. (2000) Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275**:32783-92.
- Nagase, H. and Kashiwagi, M. (2003) Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* **5**:94-103.
- Nedelec, E., Abid, A., Cipolletta, C., Presle, N., Terlain, B., Netter, P. and Jouzeau, J. (2001) Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: lack of contribution to loss of cartilage anabolism. *Biochem. Pharmacol* **61**:965-78.
- Nixon, A.J., Lust, G. and Vernier-Singer, M. (1992) Isolation, propagation, and cryopreservation of equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* **53**:2364-70.
- Norman, R.J. and Wu, R. (2004) The potential danger of COX-2 inhibitors. *Fertil Steril* **81**:493-4.
- Notoya, K., Jovanovic, D.V., Reboul, P., Martel-Pelletier, J., Mineau, F. and Pelletier, J.P. (2000) The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* **165**:3402-10.
- Ouellet, M., Falgoutyret, J.P., Ear, P.H., Pen, A., Mancini, J.A., Riendeau, D. and Percival, M.D. (2002) Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. *Protein Expr Purif* **26**:489-95.
- Pacifici, M. and Iozzo, R.V. (1988) Remodeling of the rough endoplasmic reticulum during stimulation of procollagen secretion by ascorbic acid in cultured chondrocytes. A biochemical and morphological study. *J Biol Chem* **263**:2483-92.
- Palmer, J.L. and Bertone, A.L. (1994) Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet J* **26**:263-77.

Pelletier, J.P., Fernandes, J.C., Jovanovic, D.V., Reboul, P. and Martel-Pelletier, J. (2001a) Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol* **28**:2509-19.

Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J. and Abramson, S.B. (2001b) Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* **44**:1237-47.

Pelletier, J.P., Martel-Pelletier and J., Howell, D.S. (2001) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: *Arthritis and allied conditions- A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 2195-215.

Perini, R.F., Ma, L. and Wallace, J.L. (2003) Mucosal repair and COX-2 inhibition. *Curr Pharm Des* **9**:2207-11.

Peskar, B.M. (2001) Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. *J Physiol Paris* **95**:3-9.

Peskar, B.M., Maricic, N., Gretzera, B., Schuligoi, R. and Schmassmann, A. (2001) Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. *Life Sci* **69**:2993-3003.

Platt, D. (1996a) Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: *Joint disease in the horse*. GW Trotter, editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 29-40.

Platt, D. (1996b) Isolated chondrocyte and cartilage explant culture systems as techniques to investigate the pathogenesis of equine joint disease. In: *Joint disease in the horse*. GW Trotter, editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 441-7.

Poole, A. (2001) Cartilage in health and disease. In: *Arthritis and allied conditions- A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 226-84.

Poole, A.R. (1996) Arthritis research: some present and future directions in joint disease. In: *Joint disease in the horse*. GW Trotter, editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 468-73.

Poole, A.R. and Howell, D. S. (2001) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management* 3rd Edition ed. R. Zorab editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 29-47.

Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Laverly, S. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*:S26-33.

Pruzanski, W., Bogoch, E., Katz, A., Wloch, M., Stefanski, E., Grouix, B., Sakotic, G. and Vadas, P. (1995) Induction of release of secretory nonpancreatic phospholipase A2 from human articular chondrocytes. *J Rheumatol* **22**:2114-9.

Pruzanski, W., Bogoch, E., Stefanski, E., Wloch, M. and Vadas, P. (1990) Synthesis and release of phospholipase A2 by unstimulated human articular chondrocytes. *J Rheumatol* **17**:1386-91.

Richardson, D.W. and Dodge, G.R. (2000) Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* **61**:624-30.

Robinson, D.R. (1998) Inflammation. In: *Rheumatology* 2<sup>nd</sup> ed. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 1.7.1-1.7.10.

Ronziera, M.C., Farjanel, J., Freyria, A.M., Hartmann, D.J. and Herbage, D. (1997) Analysis of types I, II, III, IX and XI collagens synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture. *Osteoarthritis Cartilage* **5**:205-14.

Sadowski, T. and Steinmeyer, J. (2001) Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **9**:407-15.

Saegusa, M., Murakami, M., Nakatani, Y., Yamakawa, K., Katagiri, M., Matsuda, K., Nakamura, K., Kudo, I. and Kawaguchi, H. (2003) Contribution of membrane-associated prostaglandin E2 synthase to bone resorption. *J Cell Physiol* **197**:348-56.

Sahap Atik, O. (1990) Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **39**:253-4.

Sailor, L.Z., Hewick, R.M. and Morris, E.A. (1996) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res* **14**:937-45.

Sandell, L.J. and Hering, T.M. (2001) Biochemistry and molecular and cell biology of articular cartilage in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management* 3rd Edition ed. R. Zorab editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 115-43.

Sauerland, K., Raiss, R.X. and Steinmeyer, J. (2003) Proteoglycan metabolism and viability of articular cartilage explants as modulated by the frequency of intermittent loading. *Osteoarthritis Cartilage* **11**:343-50.

Schuerwegh, A.J., Dombrecht, E.J., Stevens, W.J., Van Offel, J.F., Bridts, C.H. and De Clerck, L.S. (2003) Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage* **11**:681-7.

- Seguin, C.A. and Bernier, S.M. (2003) TNF $\alpha$  suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Physiol* **197**:356-69.
- Serhan, C.N. (2001) Eicosanoids. In: *Arthritis and allied conditions- A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 515-35.
- Serhan, C.N. and Levy, B. (2003) Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8609-11.
- Shalom-Barak, T., Quach, J. and Lotz, M. (1998) Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* **273**:27467-73.
- Shepherd, P.R. (2000) What can we learn by growing equine cells in culture? *Equine Vet J* **32**:366-7.
- Shigeta, J., Takahashi, S. and Okabe, S. (1998) Role of cyclooxygenase-2 in the healing of gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **286**:1383-90.
- Simon, L.S. and Strand, V. (2001) The pharmacologic treatment of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management* 3rd Edition ed. R. Zorab editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 371-91.
- Sledge, C. (1994) Biology of the joint. In: *Arthritis Surgery*, C. Sledge editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 1-21.
- Smith, M.D., Triantafillou, S., Parker, A., Youssef, P.P. and Coleman, M. (1997) Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* **24**:365-71.
- Steinmeyer, J. (2004) Cytokines in osteoarthritis-current status on the pharmacological intervention. *Front Biosci* **9**:575-80.
- Stewart, M.C., Saunders, K.M., Burton-Wurster, N. and Macleod, J.N. (2000) Phenotypic stability of articular chondrocytes In Vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res* **15**:166-74.
- Stichtenoth, D.O., Thoren, S., Bian, H., Peters-Golden, M., Jakobsson, P.J. and Crofford, L.J. (2001) Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* **167**:469-74.
- Sylvester, J., Liacini, A., Li, W.Q. and Zafarullah, M. (2004) Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes. *Cell Signal* **16**:469-76.

- Takafuji, V.A., McIlwraith, C.W. and Howard, R.D. (2002) Effects of equine recombinant interleukin-1alpha and interleukin-1beta on proteoglycan metabolism and prostaglandin E2 synthesis in equine articular cartilage explants. *Am J Vet Res* **63**:551-8.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S. and Watanabe, K. (2002) Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **291**:884-9.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M. and Kudo, I. (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* **275**:32775-82.
- Thirion, S. and Berenbaum, F. (2004) Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture. In: *Cartilage and Osteoarthritis, Cellular and molecular tools*. M Sabatini, P Pastoureau, F De Ceuninck, editor. Humana Press Inc., New Jersey. pp 1-14.
- Todhunter, R. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints. In: *Joint disease in the horse*. GW Trotter, editor. W.B. Saunders, Philadelphia. pp 1-28.
- Towle, C.A., Hung, H.H., Bonassar, L.J., Treadwell, B.V. and Mangham, D.C. (1997) Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* **5**:293-300.
- Trebino, C.E., Stock, J.L., Gibbons, C.P., Naiman, B.M., Wachtmann, T.S., Umland, J.P., Pandher, K., Lapointe, J.M., Saha, S., Roach, M.L., Carter, D., Thomas, N.A., Durtschi, B.A., McNeish, J.D., Hambor, J.E., Jakobsson, P.J., Carty, T.J., Perez, J.R. and Audoly, L.P. (2003) Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9044-9.
- Tung, J.T., Arnold, C.E., Alexander, L.H., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Venta, P.J., Richardson, D.W. and Caron, J.P. (2002a) Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *Am J Vet Res* **63**:987-93.
- Tung, J.T., Fenton, J.I., Arnold, C., Alexander, L., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Venta, P.J., Peters, T.L., Orth, M.W., Richardson, D.W. and Caron, J.P. (2002b) Recombinant equine interleukin-1beta induces putative mediators of articular cartilage degradation in equine chondrocytes. *Can J Vet Res* **66**:19-25.
- Tung, J.T., Venta, P.J., Eberhart, S.W., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Alexander, L. and Caron, J.P. (2002c) Effects of anti-arthritis preparations on gene expression and enzyme activity of cyclooxygenase-2 in cultured equine chondrocytes. *Am J Vet Res* **63**:1134-9.



Villiger, P.M., Geng, Y. and Lotz, M. (1993) Induction of cytokine expression by leukemia inhibitory factor. *J Clin Invest* **91**:1575-81.

Von Rechenberg, B., McIlwraith, C.W., Akens, M.K., Frisbie, D.D., Leutenegger, C. and Auer, J.A. (2000) Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin(PGE<sub>2</sub>) and neutral metalloproteinases(NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Equine Vet J* **32**:140-50.

Watt, F.M. (1988) Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci* **89** ( Pt 3):373-8.

Windhaber, R.A., Wilkins, R.J. and Meredith, D. (2003) Functional characterisation of glucose transport in bovine articular chondrocytes. *Pflugers Arch* **446**:572-7.

Zwicky, R. and Baici, A. (2000) Cytoskeletal architecture and cathepsin B trafficking in human articular chondrocytes. *Histochem Cell Biol* **114**:363-72.



# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant		
Judith Farley		
Sigle du programme	Titre du programme	Option
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Sciences cliniques

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs	
Judith Farley, Jean Sirois, Patrick-Hubert Mac Farlane, Aimé Kombé, Sheila Laverty	
Titre	
Co-expression de la prostaglandine E synthétase microsomale-1 et de la cyclooxygénase-2 par des chondrocytes articulaires équins suivant une stimulation par l'interleukine-1 $\beta$ .	
Revus	Date de publication
American Journal of Veterinary Research (AJVR)	Accepté

## DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration	
<p><i>A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Judith Farley inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Co-expression de la prostaglandine E synthétase microsomale-1 et de la cyclooxygénase-2 par des chondrocytes articulaires équins suivant une stimulation par l'interleukine-1<math>\beta</math>.</i></p>	
Cocauteur	Date
Jean Sirois	19/05/05
Cocauteur	Date
Patrick-Hubert Mac Farlane	21/03/05
Cocauteur	Date
Aimé Kombé	22/03/05
Cocauteur	Date
Sheila Laverty	19/06/05

<sup>1</sup> Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat mars 2001

# PERMISSION FROM THE EDITOR OF A JOURNAL<sup>1</sup>

## STUDENT IDENTIFICATION

<b>Student's name</b> Judith Farley		<b>Permanent code</b> [REDACTED]
<b>Program sign</b> M.Sc.	<b>Program title</b> Veterinary Sciences	<b>Option</b> Clinical Sciences

## ARTICLE DESCRIPTION

<b>Authors</b> Judith Farley, Jean Sirois, Patrick-Hubert Mac Farlane, Aimé Kombé, Sheila Lavery		
<b>Title</b> Co-expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 in interleukin-1-stimulated equine articular chondrocytes.		
<b>Journal number</b> Not yet assigned	<b>Pages</b> Provisionally accepted	<b>Date</b> Not yet published

## JOURNAL IDENTIFICATION

<b>Complete name of the Journal</b> American Journal of Veterinary Research (AJVR)		<b>Date</b> April 20, 2005
<b>Address</b> American Journal of Veterinary Research, American Veterinary Medical Association, 1931 N Meacham Rd, Ste 100, Schaumburg, IL 60173-4360.		

## EDITOR DECLARATION

<b>Complete name of the coordinator of rights and permissions</b> Diane A Fagen (Agent)	
<b>Declaration</b> <i>As the coordinator of rights and permissions, I authorize the microfilming of the thesis and I agree that Judith Farley will include this article in her master's degree thesis entitled: Co-expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 in interleukin-1-stimulated equine articular chondrocytes</i>	
<b>Rights and Permissions Coordinator</b> [REDACTED]	<b>Date</b> 16 May 2005

Permission granted provided the *American Journal of Veterinary Research* is clearly credited, the material is cited as « provisionally accepted » and the material is used for the stated purpose only. Permission includes authorization to reproduce the document in microfiche and to distribute single copies upon demand for scholarly use.

[REDACTED]  
Diane A Fagen  
Permissions Coordinator

16/5/2005  
Date

